

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias de la Salud

**Determinación de resistencia de ciatostomas equinos a
febendazol o ivermectina en caballos en pastoreo de Machachi,
Ecuador**

Andrea Patricia Lepoutre Rose

Juan Sebastián Galecio, MV MSc., Director de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de
Médico Veterinario

Quito, mayo de 2015

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Determinación de resistencia de ciatostomas equinos a febendazol o ivermectina en caballos en pastoreo de Machachi, Ecuador

Andrea Patricia Lepoutre Rose

Juan Sebastián Galecio, MV MSc.,
Director de Tesis

.....

Ivette Dueñas, M.V.,
Decana de Escuela de Medicina Veterinaria

.....

Francisco Cabrera, M.V.,
Miembro del Comité de Tesis

.....

Lenin Vinuesa, M.V.,
Miembro del Comité de Tesis

.....

Quito, mayo 2015

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Así mismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: _____

Nombre: Andrea Lepoutre

C. I.: 1711501948

Lugar: Quito

Fecha: Mayo de 2015

Dedicatoria

A mi mami y papi, quienes siempre me han apoyado. Sin ellos, todo esto no sería posible

Agradecimientos

Quiero ante todo agradecer al Dr. Fernando Salas ya que por su generosidad este proyecto pudo ser realizado con éxito. Así mismo agradezco a mi director de tesis, el Dr. Juan Sebastián Galecio, por ser mi guía y mi tutor este último año. Agradezco a todos los que estuvieron involucrados en la realización del estudio y reconozco la generosidad de los señores propietarios Gabriel Espinoza, Esteban Chiriboga, Rodrigo Lasso, Billy Moncayo, Andrés Moncayo, Roberto Moncayo, Benito Jaramillo, y al Capitán Navarrete. Su aporte fue fundamental en la realización del proyecto. Quiero así mismo agradecer a mi familia y a aquellos compañeros y amigos quienes me regalaron su tiempo, ayuda y apoyo en todo este proceso. Gracias por todo!

Resumen

La resistencia antihelmíntica en ciatostomas equinos es un problema mundial. No existen reportes de la situación actual respecto al tema en Ecuador. El objetivo del estudio fue determinar la presencia de resistencia antihelmíntica a febendazol o ivermectina en ciatostomas de caballos en pastoreo de Machachi, Ecuador. Se seleccionaron un total de 117 caballos de 7 propiedades en la zona. Estos fueron animales en pastoreo, entre 2 y 16 años de edad, clínicamente sanos. Con el fin de estandarizar la muestra, los animales fueron tratados con pamoato de pirantel a la dosis recomendada (6.6 mg/kg). 60 días posterior al tratamiento, se obtuvieron conteos fecales basales. Se seleccionaron aquellos animales con conteos fecales mayores a 200 huevos por gramo (n=54) y de forma aleatoria se los asignó a uno de tres grupos experimentales: febendazol (n=17), ivermectina (n=19), y control (n=18). Los tratamientos fueron administrados por vía oral, a dosis recomendadas en el día 0: febendazol (7.5 mg/kg), ivermectina (0.2 mg/kg), y placebo (yogurt). Se realizaron conteos fecales en los días 14, 28, 42, 56, y 80 post-tratamiento para hacer pruebas de reducción de oviposición y determinar períodos de reaparición de huevos. Se consideró presencia de resistencia cuando la eficacia del fármaco se encontró por debajo de 95% y cuando los límites de confianza mínimos fueron menores a 90%. Los períodos de reaparición de huevos se compararon con tiempos de reaparición conocidos para cada fármaco (febendazol: 4-5 semanas; ivermectina: 6-8 semanas). La eficacia del febendazol estuvo reducida (18.2%; LCM 0%). La ivermectina mantuvo una eficacia completa (100%; LCM 100%) y la reaparición de oviposición ocurrió entre las 6 y 8 semanas posterior al tratamiento. Los resultados sugieren que existe resistencia de ciatostomas a febendazol pero no a ivermectina en caballos de Machachi.

Abstract

Cyathostome resistance to anthelmintics in horses is a worldwide issue. There have been no reports on the current situation concerning this matter in Ecuador. The objective of this study was to determine the presence of cyathostome, anthelmintic resistance to fenbendazol or ivermectin in pastured horses from Machachi, Ecuador. A total of 117 horses from 7 stables in the area were selected. These were clinically healthy, 2 to 16 year old, pastured horses. To standardize the sample, all horses were treated with pyrantel pamoate at the recommended label dosage (6.6 mg/kg). After 60 days following this treatment, basal fecal egg counts were obtained. Horses with fecal egg counts higher than 200 hpg (n=54) were selected and randomly assigned to one of 3 experimental groups: fenbendazol (n=17), ivermectin (n=19), and control (n=18). Each treatment was given orally at recommended label dosages at day 0: fenbendazol (7.5 mg/kg), ivermectin (0.2 mg/kg) and placebo (yogurt). Fecal egg counts were then performed on all horses (n=54) at 14, 28, 42, 56 and 80 days post-treatment in order to perform fecal egg count reduction tests and determination of egg reappearance periods. Resistance was considered when efficacy was lower than 95% and lower confidence limits (LCL) were under 90%. Egg reappearance periods were compared to known egg reappearance periods for each product (FBZ: 4-5 weeks; IVM: 6-8 weeks). Fenbendazol exhibited poor efficacy (18.2%; 0 LCL.) Ivermectin demonstrated complete efficacy (100%; LCL: 100%) and egg reappearance occurred between 42 and 56 days (6 to 8 weeks) following this treatment. Results suggested that anthelmintic resistance in cyathostomes of horses in Machachi is present against fenbendazol but not ivermectin.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	7
Abstract	8
INTRODUCCIÓN.....	12
Hipótesis	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos.....	14
REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	16
Parásitos en equinos: prevalencia e importancia de los ciatostomas.....	16
Clasificación de los ciatostomas	18
Ciclo de vida de los ciatostomas	19
Factores climáticos en el ciclo de vida de los ciatostomas	21
Factores climáticos en la hipobiosis.	21
Factores climáticos en la supervivencia de huevos y larvas en el medio ambiente..	21
Ciatostomiasis: presentaciones, patogénesis y signos clínicos	24
Ciatostomiasis crónica.....	24
Ciatostomiasis aguda o ciatostominosis larvaria.....	25
Diagnóstico	25
Tratamiento y control de ciatostomas.....	27
Lactonas macrocíclicas.	28
Benzimidazoles.....	30
Tetrahidropirimidinas.	31
Protocolos de control parasitario	32
Refugia	33
Resistencia: definición e historia	33
Párametros y pruebas para medir resistencia.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
Ubicación de estudio	38
Material biológico	38
Diseño experimental	40
Grupos experimentales.....	40
Tiempos de muestreo.....	41
Obtención de muestras fecales.....	41
Análisis de muestras fecales / conteos fecales.....	42
Análisis estadístico	43
Prueba de reducción de oviposición.....	44
Determinación de período de reaparición de oviposición	45
RESULTADOS	46
Conteos fecales previo al tratamiento experimental	46
Eficacia antihelmíntica: prueba de reducción de oviposición	47
Duración de períodos de reaparición de oviposición.....	48
Sistemas de manejo y protocolos de desparasitación.....	51
DISCUSIÓN.....	53
Pruebas de reducción de oviposición	53
Período de reaparición de oviposición	59
Consideraciones para formar un protocolo de control parasitario adecuado	62
Limitaciones y fortalezas del estudio.....	69
CONCLUSIONES.....	71

RECOMENDACIONES	72
REFERENCIAS	74
ANEXOS	82

TABLAS

Tabla 1. Parásitos gastrointestinales comunes del equino	16
Tabla 2. Resistencia antihelmíntica en ciatostomas en el mundo	35
Tabla 3. Períodos de reaparición de oviposición para diferentes antihelmínticos.	37
Tabla 4. Animales de estudio: total de equinos, sexo, edad y disciplinas	39
Tabla 5 Total de caballos por propiedad en cada grupo experimental (n=54)	41
Tabla 6. Conteos fecales pre-tratamiento y post-tratamiento; (% de reducción) e intervalos de confianza (n=54)	48
Tabla 7. Relación entre conteos fecales post-tratamiento y basales en caballos tratados con ivermectina (n=19).....	50
Tabla 8. Manejo de desparasitación y pasturas en las 7 propiedades participantes del estudio.....	52

GRÁFICOS

Gráfico 1. Frecuencia de edades en población de equinos estudiada (n=54)	40
Gráfico 2. Conteos fecales previos a tratamiento experimental en 54 caballos	46
Gráfico 3. Conteos fecales en caballos del grupo control en los días 0 (basal), 14, 28, 42, 56 y 80 (n=18)).	48
Gráfico 4. Conteos fecales en caballos del grupo febendazol en los días 0 (basal), 14, 28, 42, 56 y 80 (n=17).	49
Gráfico 5. Conteos fecales en caballos del grupo ivermectina en los días 0 (basal), 14, 28, 42, 56 y 80 (n=19)	50

ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Esquema del ciclo de vida de los ciatostomas	20
Ilustración 2. Componentes y factores que tienen una influencia en el desarrollo de resistencia	65

MAPAS

Mapa 1. A.) Mapa del sector de estudio B.) Ubicación de las 7 propiedades participantes del estudio.....	38
---	----

FÓRMULAS

Fórmula 1. Huevos por gramo de heces	43
Fórmula 2. Porcentaje de reducción de oviposición	44
Fórmula 3. Comparación entre conteos fecales post-tratamiento y pre-tratamiento para establecer el intervalo de reaparición de oviposición.....	45

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación de las especies de ciatostomas	82
---	----

INTRODUCCIÓN

Según Reinemeyer (2009), “la disminución cuantificable de la eficacia de un fármaco sobre una población de parásitos previamente susceptibles” se denomina resistencia antihelmíntica. El uso indiscriminado de antihelmínticos incrementa el desarrollo de resistencia eliminando eficazmente a los parásitos susceptibles y dejando aquellos parásitos resistentes vivos y capaces de transmitir sus genes de resistencia a una nueva generación de parásitos (Sangster, 1999; Reinemeyer, 2009). Una vez que se genera resistencia en una población de parásitos, no hay manera de revertirla (Sangster, 1999). Los nemátodos en particular, al tener un alto nivel de diversidad genética en sus poblaciones, están predispuestos a desarrollar resistencia y por ende a persistir (Kaplan, 2004). Actualmente no hay desarrollo de antihelmínticos nuevos para equinos por lo que la resistencia antihelmíntica es una verdadera amenaza. Debido a que la prevalencia de resistencia en la industria equina sigue expandiéndose, se recomienda que se tomen medidas de control parasitario diferentes a aquellas que se tomaban en el pasado (Larsen et al., 2011). La resistencia es un fenómeno que va a continuar expandiéndose por lo que es importante implementar nuevas estrategias para que los antihelmínticos que todavía son eficaces mantengan sus propiedades (Kaplan & Vidyashankar, 2012). Para poder tomar decisiones sobre control parasitario, el primer paso es la evaluación de la eficacia de los antihelmínticos para saber cuáles deben ser incorporados en un plan de control integrado y conservador (Reinemeyer, 2009; Molento et al., 2012).

El equino es hospedador de varios tipos de parásitos nemátodos. Sin embargo, los ciatostomas o pequeños estrogílidos son los nemátodos patógenos principales del equino adulto (Love et al., 1999; Tarigo-Martinie et al., 2001; Peregrine et al., 2014). Un control adecuado de estos parásitos es imperativo debido a su alta prevalencia, su patogenicidad y resistencia antihelmíntica (Kaplan & Nielsen, 2010). La infección por ciatostomas afecta al equino adulto tanto de forma leve, subclínica, y crónica como de forma severa, fatal y aguda (Zajac, 2012). Para el tratamiento parasitario, el control del parásito y la prevención de la

enfermedad se han utilizado tres familias principales de antihelmínticos a lo largo de las últimas tres décadas: los benzimidazoles, las tetrahidropirimidinas, y las lactonas macrocíclicas (Kaplan & Nielsen, 2010; Canever et al., 2013; Peregrine et al., 2014).

Distintos estudios han demostrado que la resistencia de ciatostomas a la familia de los benzimidazoles es una realidad mundial, reportándose hasta el momento en 14 países (Kaplan, 2002; Peregrine et al., 2014). Con respecto a América del Sur, se ha visto resistencia a febendazol tanto en Chile como en Brasil (Canever et al., 2013; Peregrine et al., 2014). Así mismo, resistencia a la familia de las tetrahidropirimidinas se ha evidenciado en 12 países que reportan resistencia antihelmíntica al pirantel. La prevalencia de ésta ha sido históricamente más alta en Norte América, sin embargo existe más información proveniente de Europa y Brasil (Canever et al., 2013; Peregrine et al., 2014). La resistencia a las lactonas macrocíclicas es un tema de mucha preocupación. Al respecto, Kaplan (2004), sugirió que la eficacia de los antiparasitarios atribuible a la familia de las lactonas macrocíclicas en el control de los parásitos equinos ha sido percibida como excelente y ha mantenido a la industria equina bajo un “falso sentido de seguridad”. En el pasado, se habían reportado en Canadá, Alemania, Holanda, Estados Unidos e Inglaterra casos de resistencia a las lactonas macrocíclicas en otro nemátodo principal del equino, *Parascaris equorum* (Brady et al., 2009; Reinemeyer, 2012; Peregrine et al., 2014). Sin embargo, con excepción de algunos indicios previos, hasta el 2008 no se había visto resistencia como tal a las lactonas macrocíclicas en ciatostomas equinos. En el 2008, un estudio en 54 caballos en el Brasil, demostró por primera vez resistencia multidroga al determinarse ineficacia de las tres familias de antihelmínticos en el control de ciatostomas (Molento et al., 2008). En años subsiguientes se ha seguido reportando resistencia en ciatostomas hacia las lactonas macrocíclicas (Peregrine et al., 2014).

En el Ecuador, la investigación en áreas de sanidad específicamente en parásitos es reducida (Ochoa, 2013). Según Ochoa (2013), en el Ecuador, la identificación de parásitos equinos y la determinación de sus prevalencias están

ausentes, por lo que medidas de control o erradicación no pueden ser bien determinadas o establecidas. Si bien no se ha determinado el sistema de control parasitario más común, se asume una negligencia al respecto. Esto, como en muchos otros países, se debe a que la compra y venta de productos antiparasitarios es libre de restricciones y relativamente barato (Sangster, 1999; Molento, 2005; Kaplan, 2012). El método de desparasitación que más se utiliza en los centros ecuestres en Ecuador se basa en el uso de antihelmínticos cada dos meses rotando el principio activo; se estima de manera empírica que de un 100% de lugares en los que desparasitan, solo un 5% corren conteos fecales para seleccionar a aquellos animales que necesitan tratamiento antihelmíntico. Este porcentaje tan bajo se debe a la concepción errónea de que esta estrategia de control es más costosa (comunicación personal Bernal, 2014). Dada la falta de información en el Ecuador, la negligencia a nivel de campo y la creciente preocupación por el desarrollo de resistencia parasitaria a nivel mundial, se formula la siguiente hipótesis.

Hipótesis

En caballos en pastoreo de Machachi, Ecuador existe resistencia en ciatostomas a febendazol y a ivermectina.

Objetivo general

Determinar la presencia de resistencia de ciatostomas equinos a febendazol o ivermectina en caballos de la zona de Machachi, Ecuador.

Objetivos específicos

- Determinar conteos basales de huevos de ciatostomas en muestras fecales posterior a un mínimo de 60 días de descanso tras el tratamiento inicial de caballos con pamoato de pirantel.
- Determinar conteos de huevos de ciatostomas en muestras fecales posterior a tratamientos (febendazol, ivermectina y placebo) en los días 14, 28, 35, 42, 80.

- Establecer los porcentajes de eficacia de los tratamientos y establecer límites de confianza (95%) como resultado de la prueba de reducción de oviposición.
- Determinar los períodos de reaparición de oviposición para los tratamientos comparando conteos fecales pre-tratamiento con conteos fecales post-tratamiento.
- Determinar que sistemas de manejo y protocolos de desparasitación se usa en las 7 propiedades incluidas en el estudio por medio de encuestas.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Parásitos en equinos: prevalencia e importancia de los ciatostomas

Los equinos son hospedadores de muchas especies de parásitos. Un equino puede llegar a albergar alrededor de 100.000 parásitos individuales de diferentes especies (Lichtenfels et al., 2002; Pereira & Vianna, 2006). Los grupos de parásitos que predominan en el tracto digestivo de los equinos son los nemátodos y los céstodos. Dentro del grupo de los nemátodos están las familias Strongilidae, Strongyloididae, Spiruridae, Oxyuridae, Trichostrongylidae y Ascaridae. La familia Anoplocephalidae incluye a los céstodos. En la tabla 1. se presentan los parásitos que hospedan en el equino de forma común (Kaplan, 2002; Molento, 2005; Pereira y Vianna, 2006).

Tabla 1. Parásitos gastrointestinales comunes del equino (Kaplan, 2002; Molento, 2005; Pereira y Vianna, 2006)

Familia o Subfamilia	Especies comunes
Cyathostominae (Subfamilia de Strongilidae) <u>“Estrongílicos Pequeños”</u>	-Cyathostomum spp. -Cylicocyclus spp. -Coronocyclus spp. -Cylicostephanus spp.
Strongylinae (Subfamilia de Strongilidae) <u>“Estrongílicos Grandes”</u>	- <i>Strongylus vulgaris</i> - <i>Strongylus edentatus</i> - <i>Strongylus equinus</i>
Strongyloididae	- <i>Strongyloides westeri</i>
Spiruridae	- <i>Habronema muscae</i> - <i>Setaria equina</i>
Oestridae	- <i>Gasterophilus</i> spp.
Oxyuridae	- <i>Oxyuris equi</i> - <i>Probstmayria vivipara</i>
Anoplocephalinae	- <i>Anoplocephala perfoliata</i>
Ascaridae	- <i>Parascaris Equorum</i>
Trichostrongylidae	- <i>Trichostrongylus axei</i>
Dictyocaulidae	- <i>Dictyocaulus arnfieldi</i>

En un estudio que se realizó en 798 caballos en Venezuela, se identificaron los nemátodos más prevalentes. En orden de importancia estuvieron los estrogílicos, *Parascaris equorum* y *Oxyurus equi* (Morales et al., 2012). De las 100 especies de parásitos internos que son capaces de parasitar al equino, alrededor del 50% forman parte del grupo de los estrogílicos (Lyons et al., 1999). Se considera que los estrogílicos de las subfamilias Strongylinae (estrogílicos grandes) y Cyathostominae (estrogílicos pequeños) son los parásitos más comunes del equino (Baudena, 2003; Prokulewicz et al., 2014). De estos, los ciatostomas o estrogílicos pequeños presentan la prevalencia más alta. Entre 85 y 100% de los helmintos intestinales son ciatostomas (Uhlinger, 1993). Tomando en cuenta que 100% de los caballos en pastoreo están infectados con ciatostomas (Lyons et al., 1999; Reinemeyer, 2009), es imprescindible remarcar la importancia de estos ya que pueden ser responsables de altos niveles de morbilidad y mortalidad en caballos (Proudman y Matthews, 2000).

Para el año 1960, el parásito con más importancia por sus efectos patogénicos era *Strongylus vulgaris* (Subfamilia: Strongilinae) (AAEP, 2013; Drudge & Lyons, 1966). *Strongylus vulgaris* afecta de manera común a equinos mayores de un año de edad causando cólico por arteritis, tromboembolismo y como consecuencia, infarto intestinal no estrangulante (Reinemeyer & Nielsen, 2009). En aquellos años, la prevalencia de *Strongylus vulgaris* se encontraba entre el 80 y 100% (Nielsen et al., 2012). El uso de antihelmínticos, en particular de las lactonas macrocíclicas, con un sistema de dosificación a intervalos para el control del parásito demostró ser innovador y eficaz. Como consecuencia, la incidencia de cólicos causados por *Strongylus vulgaris* disminuyó significativamente (Kaplan et al., 2004; Reinemeyer & Nielsen, 2009; Zajac, 2012). Si bien hubo un nivel exitoso de reducción en la prevalencia (5%) de *Strongylus vulgaris*, la prevalencia de los ciatostomas equinos incrementó a 100% (Kaplan, 2002; Kaplan et al., 2004; Nielsen et al., 2012). Esto hizo, que en el año 1980 los ciatostomas sean reconocidos como los parásitos principales y más importantes del equino adulto (Kaplan et al., 2004).

Por otro lado, en caballos menores a dos años de edad, *Parascaris equorum*, un nemátodo de la familia Ascaridae que se encuentra en el intestino delgado, presenta una mayor prevalencia y se considera el parásito patógeno principal en potros (AAEP, 2013; Kaplan, 2004; Reinemeyer, 2012). Este parásito es común en potros menores de un año de edad, sin embargo animales mayores (1 a 4 años de edad) donde el sistema inmune es más efectivo controlando al parásito pueden mantener cargas parasitarias bajas de *P. equorum*. La infección parasitaria por parte de este organismo, se relaciona con signos clínicos gastrointestinales inespecíficos y leves; sin embargo, puede causar la muerte del equino (Brady et al., 2009; Nareaho et al., 2011). Los signos clínicos incluyen: tos, descarga nasal, letargia, anorexia, falta de brillo de pelaje, pérdida de peso o ganancia del mismo, diarrea y cólico (Peregrine et al., 2014). Por lo general, la muerte ocurre tras un episodio de tratamiento con antihelmínticos efectivos y el cólico subsiguiente que se genera por la impactación de los parásitos que mueren “en masa” y obstruyen el lumen intestinal (Reinemeyer & Nielsen, 2009). Cabe recalcar la importancia de este parásito debido a que el énfasis que se ha puesto en controlar la población de ciatostomas ha provocado que existan más reportes sobre la emergencia de resistencia en poblaciones de *P. equorum* (Brady et al, 2009).

Clasificación de los ciatostomas

(Familia: *Strongylidae*, Subfamilia: *Cyathostominae*)

Se conoce a los ciatostomas como “gusanos rojos y pequeños” por su tamaño menor a 2,5 cm y su apariencia rojiza (Corning, 2009). Existen alrededor de 50 especies de ciatostomas que se distribuyen en 14 géneros (Lichtenfels et al., 2008). Más de 40 pueden encontrarse como huéspedes de los equinos, sin embargo se han identificado entre 10 y 12 especies como las más prevalentes (Lyons et al., 1999; Kaplan, 2002; Zajac 2012). En el Anexo 1, se reconocen los 14 géneros de la subfamilia Ciatostominae y sus respectivas especies.

Ciclo de vida de los ciatostomas

Estos nemátodos al igual que otros, tienen un ciclo de vida directo sin la intervención de un huésped intermediario. Se indica que el ciclo de vida de los ciatostomas (Gráfico 1) es un ciclo “rápido”, ya que el período pre-patente, tiene un rango de duración entre 35 y 42 días (Corning, 2009). Si bien los ciatostomas están muy relacionados a los estrongílicos grandes como *S. vulgaris*, estos se diferencian en que los ciatostomas no incluyen una etapa de migración somática en su ciclo de vida (Reinemeyer & Nielsen, 2009). Los parásitos adultos se alojan en gran número en el intestino grueso. En este estadio, las hembras depositan sus huevos, los cuales salen al medio ambiente a través de las heces (Corning, 2009; Reinemeyer & Nielsen, 2009; Zajac 2012). Al observar un huevo de ciatostoma, se puede ver claramente la larva dentro de este; por ende, los huevos de ciatostomas se clasifican como huevos embrionados. Una vez fuera del hospedero se da la eclosión de los huevos y se da paso a la larva 1 (L1) la cual se desarrolla en larva 2 (L2). Tanto la L1 como la L2 son larvas pre-infectivas y tienen la capacidad de alimentarse en el medio ambiente. Éstas pasan a ser larvas infectivas o de tercer estadio (L3) las cuales desarrollan una membrana protectora que les permite sobrevivir en condiciones de temperaturas de congelamiento. Esta membrana impide que la larva pueda seguir ingiriendo alimento (Nielsen et al., 2007). En las pasturas, el caballo ingiere la L3, la cual se desprende de su membrana protectora y se introduce en la mucosa y submucosa de la pared intestinal del ciego y del colón ventral (Corning, 2009; Reinemeyer & Nielsen, 2009; Zajac, 2012).

Una vez en la mucosa, la L3 desarrolla una cápsula o quiste fibroso que la mantiene separada del sistema inmune del hospedero (Reinemeyer & Nielsen, 2009). Una vez enquistada, el destino de la L3 puede variar. La L3 puede madurar a L3 de “estadio tardío” (L3T) y continuar su maduración a larva 4 en desarrollo (DL4). La larva 4 (L4 luminal) migra hacia el lumen y ahí madura a larva pre-adulta de 5^{to} estadio (L5). Finalmente, la L5 se vuelve larva adulta (Clark et al., 2005). Por lo general, la maduración de la L3T a L4 dura desde 6 hasta 12 días. El tiempo que le toma a la L4 para salir hacia el lumen intestinal para

continuar su maduración a larva adulta toma entre 30 a 60 días (Collobert-Laugier et al., 2002 citado en Zarate, 2012; Zajac, 2012).

Sin embargo, hasta un 90% de las L3 que se enquistan en la mucosa intestinal, pueden no continuar su curso de maduración a L4. Por lo general, la L3 de “estadio temprano” (EL3) entra en un período de latencia o inhibición del desarrollo (Corning, 2009; Chapman et al., 2012 citado en Zarate, 2012; Molento et al., 2012). En este período, EL3 detiene su proceso de maduración posiblemente debido a factores ambientales y biológicos todavía no comprendidos (Davidson et al., 2005 citado en Zarate, 2012). Hasta que exista algún tipo de estimulación que reanude su proceso de maduración a L4, la L3 se mantiene en un estado denominado hipobiosis (Brianti et al., 2009 citado en Zarate, 2012). Un período de hipobiosis puede durar desde 4 meses hasta 3 años (Corning, 2009; Zajac, 2012).

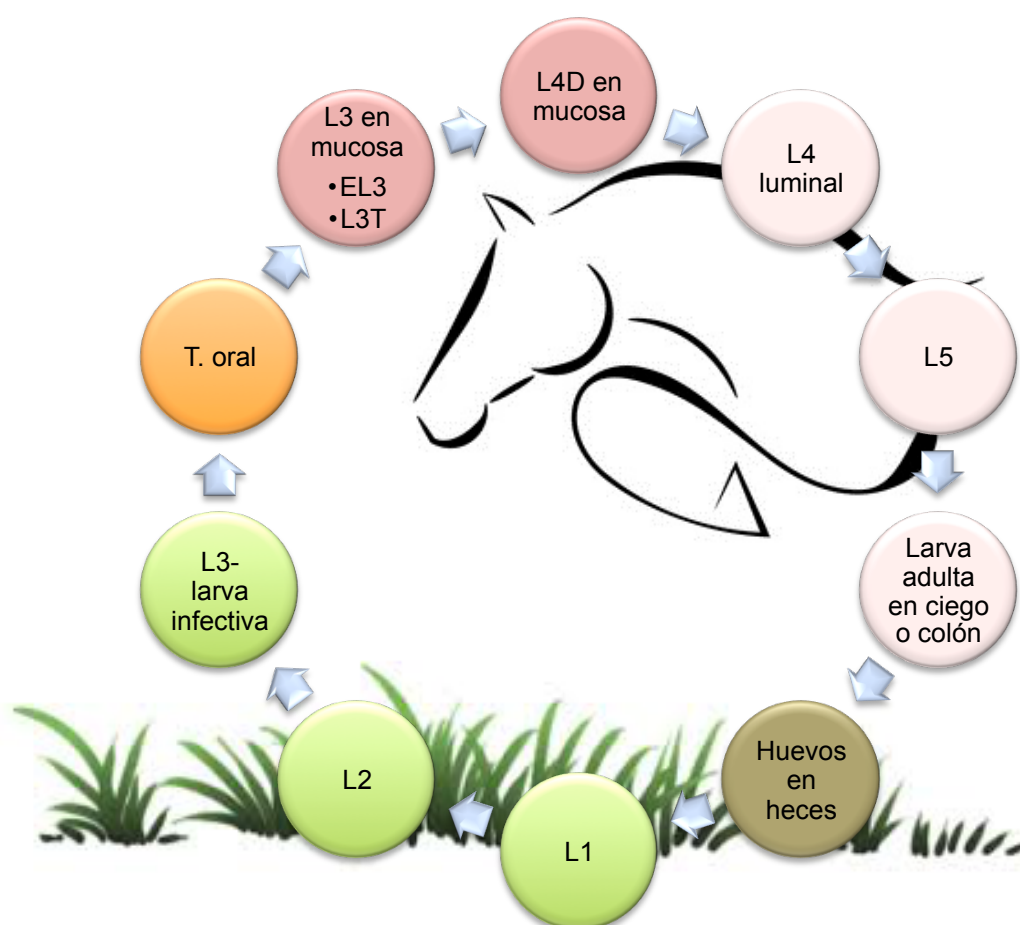


Ilustración 1. Esquema del Ciclo de Vida de los Ciatostomas (modificado de Corning, 2009)

Factores climáticos en el ciclo de vida de los ciatostomas

Factores climáticos en la hipobiosis.

Si bien la causa directa por la que la hipobiosis se da en los estadios larvarios en los ciatostomas no está dilucidada (Davidson et al., 2005; Reinemeyer, 1999), se piensa que este es un mecanismo de protección contra condiciones medio ambientales extremas las cuales afectarían a los estadios ambientales (Nielsen et al., 2014b; Ogbourne, 1975 citado en Zarate, 2012). Corning (2009) sugiere que la hipobiosis ocurre en climas fríos en lugares donde existe un clima más templado. En estos casos, la emergencia de estadios maduros de larvas se observa en primavera. Por otro lado, en lugares tropicales, el tiempo de inhibición está caracterizado por temperaturas altas. La emergencia de larvas se da en otoño cuando las temperaturas bajan y se vuelven más óptimas. Estudios *in-vitro* donde se expusieron larvas de ciatostomas a temperaturas bajas confirman la tendencia natural de las larvas a entrar en estados hipobióticos (Brianti et al., 2009 citado en Zarate, 2012). Sin embargo, existe evidencia científica que cuestiona si se puede considerar a las temperaturas bajas como la razón primordial a este arresto metabólico (Davidson et al., 2005 citado en Zarate, 2012). La hipobiosis también se ha atribuido a factores de inmunidad del hospedero (Reinemeyer, 1999).

Factores climáticos en la supervivencia de huevos y larvas en el medio ambiente

La relación climática con la supervivencia de larvas en el medio ambiente es más compleja. Existen estudios sobre la prevalencia de larvas en pasturas en climas templados del norte, tropicales y subtropicales (Ramsey et al., 2004). Los climas templados del norte tienen cuatro estaciones marcadas, los períodos de lluvia son uniformes y los inviernos son fríos. Estudios sobre la supervivencia de larvas en pasturas en este tipo de climas se han llevado a cabo en el norte de Estados Unidos, Gran Bretaña y en el norte de Europa. Por otro lado, ciertos climas tropicales, subtropicales y templados del sur como el sur de Estados

Unidos, el sur de Europa y Australia se caracterizan por la débil diferenciación de estaciones. Estos lugares son primariamente cálidos o muy calientes y las heladas son poco comunes y ocurren esporádicamente. También existen reportes de estos patrones en Brazil (Quinelato et al., 2008; Santos et al., 2011). Cabe recalcar que los estudios sobre supervivencia de larvas hace distinción entre supervivencia de larvas infectivas (L3) y de la supervivencia de estadíos pre-infectivos (huevos, L1, L2) y su desarrollo hacia L3.

En los climas templados del norte, el desarrollo de estadíos larvarios es alto en pasturas durante los meses de primavera, verano y otoño temprano. En estos lugares templados, el desarrollo tanto de huevos como de larvas se ve afectado negativamente en meses donde las temperaturas son bajas evidenciando que el patrón de supervivencia de L3 en el invierno depende de más factores (Courtney, 1999; Baudena, 2003; Nielsen et al., 2007). En ciertos lugares templados, como por ejemplo Inglaterra y Escocia, las temperaturas durante el invierno no son constantes: las temperaturas varían mucho y pueden encontrarse tanto bajo cero como por encima de los 8°C. Estudios en condiciones de laboratorio, han demostrado que todos los estadíos larvarios de ciatostomas mueren cuando están expuestos a temperaturas fluctuantes de congelamiento y descongelamiento. En Inglaterra, se observó que la supervivencia de L3 es mayor cuando las temperaturas bajas están por encima de los 0°C (Nielsen et al., 2007). Se observó adicionalmente que la supervivencia de L3 era más alta cuando había presencia de lluvia (Ramsey et al., 2004). En contraste, en países donde las temperaturas son constantemente bajas (<0°C) en el invierno, la supervivencia de L3 es mayor (Nielsen et al., 2007). Según Bemrick (1978), en condiciones de laboratorio, las L3 son capaces de sobrevivir temperaturas bajas hasta de -196°C. De hecho, bajo estas condiciones extremas de temperaturas bajas, los huevos y larvas son reservorios infecciosos que tienen la potencialidad de sobrevivir por meses (Ramsey et al., 2004). Por ende, en lugares templados del norte la supervivencia de L3 durante el invierno depende de cuan estable sea la temperatura baja. Bajo una capa de nieve, las temperaturas son bajas pero muy estables; sin capa de nieve, las temperaturas pueden fluctuar mucho con las corrientes de aire, afectando la supervivencia de las larvas. Por esto, en lugares

donde hay caída de nieve, la supervivencia tanto de huevos como de larvas infectivas es mayor. Esto se evidenció en estudios conducidos en Suecia y en el estado de Ohio en Estados Unidos, donde se observó que la supervivencia de las larvas infectivas es mayor en inviernos fríos y en veranos frescos (Nielsen et al., 2007).

Hay pocos estudios que revelan el efecto del clima en la supervivencia de huevos y estadíos larvarios en lugares tropicales y subtropicales (Quinelato et al., 2008). Sin embargo, tanto para el desarrollo como para la supervivencia y migración de los estadíos en pasturas, los factores más importantes son temperatura, humedad y pluviosidad (Quinelato et al., 2008). En estudios de laboratorio, se aprecia que el desarrollo tanto de huevos como larvas ocurre en temperaturas entre 25°C y 33°C. Una temperatura ideal de 28°C promueve el desarrollo y resulta en el mayor número de larvas infectivas en 3 a 4 días (Ogbourne, 1972 citado en Nielsen et al., 2007; Mfitlodze & Hutchinson, 1987). En lugares tropicales y subtropicales donde las temperaturas pueden ser muy altas, los factores que promueven supervivencia de las larvas son opuestos a aquellos factores necesarios para el desarrollo de las mismas; es decir que aquellos factores que favorecen el desarrollo de las larvas, actúan negativamente sobre la supervivencia de ellas (Nielsen et al., 2007; Quinelato et al., 2008; dos Santos et al., 2011). Estos factores son temperatura y humedad. Considerando temperatura y humedad alta, tanto el desarrollo larvario a L3 como la migración de larvas desde la materia fecal a las pasturas, incrementa. Sin embargo la supervivencia de las larvas infectivas se ve reducida. Por otro lado, con las mismas condiciones de temperatura, la desecación afecta al desarrollo de los estadíos larvarios pero la supervivencia de L3 es mayor en materia fecal. Para que la L3 contamine las pasturas en condiciones de sequía, debe haber un incremento de la humedad. En ese caso, la migración y traslado de larvas desde la materia fecal a la pastura se puede dar. Sin embargo, si la humedad persiste la supervivencia de la larva infectiva baja. Por ende, en lugares tropicales y subtropicales el factor limitante para el desarrollo y supervivencia larvario depende de una temperatura óptima (Nielsen et al., 2007; de Santos et al., 2011). Como consecuencia, en estos

lugares, la supervivencia de huevos y larvas es mayor en los meses más frescos que, por lo general, coinciden con el invierno (AAEP, 2013).

Ciatostomiasis: presentaciones, patogénesis y signos clínicos

En el pasado, la importancia de los efectos patogénicos de los ciatostomas estaba subestimada ya que las lesiones causadas por *Strongylus vulgaris*, eran más evidentes. La infección por ciatostomas por lo general es subclínica y pueden causar pérdida de peso, pelaje duro, falta de crecimiento y disminución de rendimiento (Reinemeyer, 1999; Tarigo Martinie et al., 2001; Tandon & Kaplan, 2004; Reinemeyer, 2009). Al ser signos clínicos muy inespecíficos, la importancia de la patogenidad de los ciatostomas ha sido minimizada (Love et al., 1999). Se describen dos tipos de presentaciones de la infección por ciatostomas; la ciatostomiasis larvaria crónica y la ciatostomiasis larvaria aguda (Zajac, 2012).

Ciatostomiasis Crónica.

La ciatostomiasis larvaria crónica se caracteriza por la colonización y enquistamiento de L3 y el abandono de L4 de la pared intestinal. Un gran número de L3 se enquistan en la mucosa y submucosa de forma progresiva y lenta (Zajac, 2012). Este ingreso de larvas en la pared del intestino, induce reacciones inflamatorias específicamente tiflitis y colitis (Love et al., 1999). En un caballo clínicamente sano pueden haber más de 200.000 larvas enquistadas (Molento et al., 2012). Las L3 se aíslan en estos quistes fibrosos tanto de la respuesta inmunitaria del hospedero como de la mayoría de los fármacos utilizados para su eliminación. (Reinemeyer & Nielsen, 2009; Corning, 2009). Al estar lista la L4 para salir del quiste y migrar al lumen del intestino, se liberan productos tanto secretorios y excretorios acumulados a través del tiempo de desarrollo de la larva en el quiste. La emergencia de las larvas y evacuación de los contenidos de los quistes, inducen una respuesta inflamatoria a nivel focal. Consecuentemente, hay congestión, acumulación de líquido, y pérdida de proteína a través de la pared intestinal. Cada día, cientos de larvas emergen hacia el lumen intestinal causando daño focal y acumulativo (Reinemeyer & Nielsen, 2009; Beltrao et al., 2012). Esto condiciona que el intestino se vea impedido en su función de absorción de

nutrientes por el daño de la mucosa colónica y cecal (Corning, 2009; Zajac, 2012; Nielsen et al., 2013). En estos animales, se pueden observar signos como pérdida de condición corporal, falta de crecimiento, apariencia dura del pelo y signos consistentes con hipoproteinemia producto de la enteropatía. Si bien la larva es la protagonista de la ciatostomiasis crónica, en infestaciones altas, los ciatostomas adultos también van a causar signos inespecíficos parasitarios de letargia, pérdida de peso, debilitamiento, cólico y diarrea (Love et al., 1999; Corning, 2009; Zajac, 2012; García et al., 2012).

Ciatostomiasis aguda o ciatostominosis larvaria.

La ciatostomiasis aguda, también conocida como ciatostominosis larvaria o “diarrea de primavera”, ocurre cuando hay una emergencia sincronizada de las larvas enquistadas hacia el lumen intestinal. Se utiliza el término, “en masse” o “en masa”, para describir el movimiento sincronizado de miles de larvas a través de la pared del intestino. El daño que se provocado en la mucosa colónica y cecal causa diarrea y cólico severo (Proudman & Matthews, 2000; Reinemeyer & Nielsen, 2009; Corning, 2009; Zajac, 2012). Entre los hallazgos de laboratorio consistentes están hipoproteinemia, hipoalbuminemia, macrocitosis e incremento de fibrinógeno sanguíneo. Otros signos son debilitamiento, edema subcutáneo ventral y pirexia (Nielsen et al., 2013; Peregrine et al., 2014). La mortalidad es del 50% con esta presentación y el tratamiento muchas veces es inefectivo (Proudman & Matthews, 2000; Reinemeyer y Nielsen, 2009; Corning, 2009; Zajac, 2012).

Diagnóstico

El examen fecal cuantitativo (conteo de huevos en materia fecal) es una herramienta utilizada específicamente para el control de parásitos. En equinos, es una técnica indicada para el control de *P. equorum* y *Strongylus* spp. (Zajac, 2012). Si bien esta prueba tiene sus desventajas, ésta es necesaria para evaluar eficacia antihelmíntica, estimar niveles de parasitismo individual y su potencial de contaminación del medio ambiente (Reinemeyer, 2009). También se utiliza para

determinar la relación entre *P. equorum* y *Strongylus* spp. en animales jóvenes (AAEP, 2013).

El valor de una prueba cuantitativa se basa en su nivel de sensibilidad. Mientras menor sea el número de huevos por gramo, la sensibilidad es más alta por ende la prueba tiene mayor valor diagnóstico. La prueba cuantitativa que más se utiliza por facilidad y conveniencia es la prueba de conteo fecal, McMaster modificada. Por lo general, esta prueba puede contar con una sensibilidad mínima de 25 huevos / gramo (Nielsen, 2014). Una prueba derivada de la prueba McMaster es la técnica FLOTAC (Técnica de flotación por centrifuga; Cringoli, 2006). Esta está validada y se prefiere al momento de analizar la eficacia de un antihelmíntico ya que ésta tiene una sensibilidad de 1 huevo / gramo. Sin embargo, por temas de costo y comodidad, se prefiere utilizar la McMaster Modificada (Nielsen, 2014; Luksovsky et al., 2013). Una prueba auxiliar que también se puede llevar a cabo es la prueba cualitativa modificada de Wisconsin la cuál, similar a FLOTAC, presenta una sensibilidad de 1 huevo / gramo (Brady et al., 2009; AAEP. 2013).

Si bien el exámen fecal cuantitativo es el “estándar dorado” para el control de parásitos, frente a cualquier caso de enfermedad clínica por infección de ciatostomas, el conteo de huevos no tiene valor diagnóstico por varias razones. La primera razón toma en cuenta la prevalencia de los ciatostomas en los equinos. Como ya se ha mencionado, los ciatostomas son ubicuos en todos los equinos; esto quiere decir que 100% de los animales van a ser positivos al conteo fecal. Por otro lado, al ser los huevos productos de la reproducción sexual de los parásitos adultos en el lumen intestinal, este parámetro de medición solo toma en cuenta la presencia de parásitos adultos mas no indica la severidad de la infección a nivel tisular por parte de larvas en desarrollo o en estado de latencia. Además, los conteos de huevos no reflejan el número real de parásitos adultos presentes en el lumen intestinal ni tienen correlación con la severidad de la enfermedad (Reinemeyer, 2009; Zajac, 2012; AAEP, 2013). Por ende, el diagnóstico de enfermedad parasitaria por ciatostomas, se basa en patrones de presentación clínica más no por resultados de conteo de huevos en materia fecal

(Nielsen, 2014). No existen signos patognomónicos que permitan concluir el diagnóstico de ciatostominosis; sin embargo, muchos de estos animales presentan material fecal blando, concentraciones de proteínas plasmáticas bajas por hipoalbuminemia y neutrofilia (Love et al., 1999; Nielsen, 2014b). Algunos hallazgos hematológicos que se han visto con menos consistencia han sido anemia, eosinofilia, y elevada actividad de la fosfatasa alcalina (Love et al., 1999).

En la ciatostominosis aguda, otro signo clínico que puede ser diagnóstico de la enfermedad es el alto número de larvas en heces (Reinemeyer & Nielsen, 2009). Para obtener información sobre la presencia de larvas en heces, el cultivo de éstas es esencial. El cultivo de larvas y su caracterización son importantes, ya que los huevos que se cuantifican al momento de realizar el conteo fecal no se pueden diferenciar entre aquellos de *Strongylus vulgaris* y aquellos de los ciatostomas. En caballos que reciben algún tipo de manejo, por lo general 99% de los huevos identificados como huevos de *Strongylus* spp. pertenecen a ciatostomas. En caballos ferales o de pobre manejo, este porcentaje varía de 90% a 95% (AAEP, 2013). En una encuesta llevada a cabo en Dinamarca, 41% de clínicas equinas llevan a cabo cultivos larvarios para la diferenciación de larvas en heces (Nielsen et al., 2006). Si bien, el cultivo larvario es posible, no es una prueba que se hace rutinariamente ya que muchos laboratorios comerciales no la ofrecen (AAEP, 2013). Así mismo, existen pruebas moleculares para la identificación y estudios genéticos de estos parásitos (Zarate, 2012).

Tratamiento y control de ciatostomas

El tratamiento de enfermedad clínica por infección por ciatostomas se basa en terapia de soporte. Esto incluye administración de fluidos y antiinflamatorios no esteroideos, restablecimiento de las concentraciones de proteínas plasmáticas y tratamiento antihelmíntico efectivo contra los estadios larvarios enquistados de los ciatostomas. Se utiliza la moxidectina como tratamiento de elección por su efectividad contra dichos estadios. Asumiendo sensibilidad hacia el producto, una dosis alta de febendazol administrada consecutivamente por 5 días también ha

resultado efectivo en el control de parásitos enquistados en la pared intestinal (Nielsen, 2014).

Desde el año 1900, 25 productos antihelmínticos han sido comercializados para ser utilizados como agentes para quimioterapia preventiva o de control contra endoparásitos en equinos (Lyons et al., 1999). El control de ciatostomas se basa principalmente en el uso de antihelmínticos de las siguientes familias: lactonas macrocíclicas (ivermectina y moxidectina), benzimidazoles (febendazol, oxfendazol, oxibendazol), y tetrahidropirimidinas (pamoato de pirantel y tartrato de pirantel) (Tarigo-Martinié et al., 2001; Matthews et al., 2011; Kaplan & Nielsen, 2010). Las piperazinas podrían considerarse una cuarta familia sin embargo su uso es muy limitado (Tarigo-Martinié et al., 2001).

Lactonas macrocíclicas.

Las lactonas macrocíclicas son fármacos hidrofóbicos que se derivan de productos de la fermentación por parte de bacterias saprofitas del género *Streptomyces* (Zarate, 2012). Éstas son utilizadas de manera común en Medicina Veterinaria por su efectividad contra un amplio espectro de endoparásitos y ectoparásitos. Desde su desarrollo en el año 1980, las lactonas macrocíclicas tuvieron éxito por su actividad contra varios organismos con bajos niveles de toxicidad y su facilidad de administración (Prichard et al., 2012). Si bien se usan dosis comparativamente bajas, su potencia es alta y mantiene un cierto nivel de actividad residual persistente (Sangster, 1999).

La familia de las lactonas macrocíclicas se dividen en dos subfamilias: las avermectinas y las milbectinas (Molento et al., 2012; Zarate, 2012; Prichard et al., 2012). Los fármacos de las dos subfamilias tienen características similares en cuanto a mecanismo de acción (Pérez et al., 1999). Todas las lactonas macrocíclicas tienen una estructura que les permite interactuar con ambos canales iónicos de cloro dependientes de glutamato (receptores GluCl) y canales mediados por GABA-A en nemátodos y artrópodos (Cobb & Boeckh, 2009). Los receptores GluCl se pueden encontrar en membranas de células somáticas

musculares de la faringe y útero y en neuronas (Márquez, 2003). La interacción del fármaco con los receptores incrementa la entrada de cloro a las células musculares y neuronales asociadas, inhibiendo la contracción muscular. El resultado es parálisis flácida somática y parálisis faríngea. Esta última, previene que el parásito pueda ingerir alimento (Sangster, 1999; Zarate, 2012). Por esto, las lactonas macrocíclicas tienen un efecto general inhibitorio sobre el desarrollo y motilidad de los parásitos (Zarate, 2012). Así mismo, la capacidad de fecundidad del parásito se ve afectado (Márquez, 2003).

Si bien los fármacos de las avermectinas y milbectinas tienen similitud en su estructura y modo de acción, las diferencias estructurales entre ellas definen diferencias marcadas en cuanto a farmacocinética, farmacodinámica, y toxicología (Pérez et al. 1999). Por esto los fármacos de las dos subfamilias interactúan de manera distinta con proteínas de membrana tanto en el parásito como en el hospedador (Cobb & Boeckh, 2009; Prichard et al., 2012).

Las dos lactonas macrocíclicas que se comercializan para equinos son la ivermectina (ivermectina) y la moxidectina (milbectina) (Sangster, 1999). Ambas lactonas macrocíclicas tienen propiedades individuales que las diferencian entre ellas. En la industria equina, la ivermectina tiene presentaciones en pasta o líquido. Por otro lado, la moxidectina tiene solamente presentaciones en pasta (Zarate, 2012).

En el año 1980, el modo de uso de la ivermectina en equinos era subcutáneo y la dosis variaba entre 0,1 a 0,8 mg/kg. La vía de administración intramuscular también fue utilizada con resultados satisfactorios; sin embargo, posteriores reacciones adversas hicieron que la presentación intramuscular no se comercialice más y se abrió paso a las formas orales (pasta y líquido para la administración por sonda nasogástrica). Estudios con el objetivo de ver la eficacia de diferentes dosis, demostraron que la dosis efectiva para eliminar la mayoría de parásitos de importancia en el equino es de 0,2 mg/kg (Molento et al., 2012; Zarate, 2012).

Los parásitos susceptibles a la ivermectina son *Strongylus* spp. (larvas migrantes y adultas), *Triodontophorus* spp., *Trichostrongylus axei*, *Gasterophilus* spp., *Oxyuris equi*, *Parascaris equorum*, *Dictyocaulus arnfieldi*, *Habronema muscae*, *Draschia megastoma* y *Onchocerca cervicalis*. La susceptibilidad de los ciatostomas a la ivermectina difiere por especie; sin embargo, la dosis recomendada de 0,2 mg/kg es efectiva en el control de estos parásitos (Sangster, 1999; Molento et al., 2012; Zarate, 2012). La moxidectina e ivermectina tienen acción sobre el mismo espectro, controlando la mayoría de parásitos del equino con excepción de *Anoplocephala perfoliata*. La dosis que se recomienda para la moxidectina es 0.4 mg/kg (Sangster, 1999; Pérez et al., 1999; Cobb & Boeckh, 2009). Cabe recalcar que algunas avermectinas como la doramectina, la abamectina, y la epinomectina no están licenciadas para el control o tratamiento en equinos (Zarate, 2012). Sin embargo, estudios efectuados evaluando el efecto de la doramectina sobre nemátodos en equinos evidencian un 96-100% de eficacia (Pilarczyk et al., 2014). Por otro lado, el uso de la eprinomectina en equinos se ha limitado al tratamiento de *Dyctiocaulus arnfieldi* en burros (Zarate, 2012; Prichard et al., 2012).

Benzimidazoles.

Los benzimidazoles salieron al mercado en el año 1961 con el tiabendazol como precursor y reemplazo de la fenotiazina. Antes de la presentación del organofosforado diclorvos, se consideraba que los benzimidazoles eran la familia con el espectro de actividad más amplio y de mínima toxicidad (Lyons et al., 1999; Márquez, 2003). Los benzimidazoles tuvieron acogida por tener un índice terapéutico alto a dosis bajas (Lacey, 1990). Todos los benzimidazoles tienen una base química común: un 1,2 diaminobenceno. Características de farmacocinética y alcance de espectro dependen de cambios en el carbono 5 del anillo bencénico (Márquez, 2003).

Entre los fármacos de esta familia que han sido utilizados para el control parasitario en caballos están: febendazol, cambendazol, oxibendazol, oxfendazol, y mebendazol (Lyons et al., 1999). Sin embargo, de estos solamente el

febendazol, oxbendazol y el oxfendazol se encuentran disponibles en el mercado (Lyons et al., 1999; Tarigo Martinie et al., 2001). El febantel es un probenzimidazol; esto quiere decir que una vez en el organismo hospedero, el fármaco se metaboliza a febendazol y oxfendazol. Antes de generar resistencia, este probenzimidazol era eficiente en la eliminación de ascaris, estrongílicos grandes y pequeños, y *Oxyuris equi* (Lyons et al. 1999). Los productos que se venden en la actualidad tienen presentaciones en líquido, pasta o peletizado (AAEP, 2013).

La eficacia de los benzimidazoles radica en su mecanismo de acción por la cual previene la polimerización de tubulina en los nemátodos previniendo que las subunidades de proteína alfa y beta se unan (Márquez, 2003; Witzendorff et al., 2003). En los nemátodos, la estructura y funcionalidad del citoesqueleto de las células intestinales se ven alteradas, por lo que su supervivencia se ve afectada (Márquez, 2003). Al ser la tubulina un componente proteico en todos los citoesqueletos de células eucariotas, el nivel bajo de toxicidad de los benzimidazoles en células mamíferas ha sido cuestionada (Lacey, 1990). Sin embargo, la afinidad de estos productos por la tubulina es mayor en helmintos que en mamíferos (Witzendorff et al., 2003). Los benzimidazoles también tienen efecto sobre los parásitos al inhibir su capacidad de producir energía afectando la acción de la fumarato reductasa, una enzima esencial en este proceso (Márquez, 2003).

Tetrahidropirimidinas.

En la industria equina, han estado disponibles las siguientes sales de pirantel.: el pamoato, el tartrato, y el hidrocloreto (Lyons et al., 1999). Su mecanismo de acción se basa en la despolarización en la unión neuromuscular causando parálisis rígida del parásito. La eficacia de las sales de pirantel radica tan solo en la eliminación de los estadios adultos de nemátodos presentes en el lumen intestinal (AAEP, 2013). El tartrato de pirantel se administra de forma diaria de manera profiláctica a una dosis de 2,64 mg/kg. Se pretende usar el tartrato de pirantel para matar a los estadios L3 ingeridos y prevenir su

enquistamiento en la pared intestinal. Por otro lado, el pamoato de pirantel se administra a una dosis de 6,6 mg/kg. En un estudio de resistencia, se sugiere que hacer pruebas de resistencia hacia el pamoato de pirantel es importante antes de implementar dosis profilácticas de tartrato de pirantel (Brazik et al., 2006). El pamoato de pirantel se presenta como suspensión o pasta; el tartrato de pirantel por lo general se formula en peletizados de alfalfa (AAEP, 2013).

Protocolos de control parasitario

Entre los protocolos de control parasitario, se destacan 3 métodos comunes: control a intervalo, control estratégico, y control selectivo. El uso del sistema de tratamiento a intervalo supone la administración del antihelmíntico en períodos de tiempo exactos consecuentes con el período de reaparición de huevos (Stratford et al., 2013). Este sistema fue implementado con la introducción de los benzimidazoles en el año 1960, donde se recomendaba la utilización de estos cada 8 semanas. En los años 1970 y 1980, nuevos antihelmínticos salieron al mercado. Como práctica común, se comenzó a utilizar el sistema a intervalo utilizando diferentes fármacos de forma rotacional, de esta forma, los fármacos que no eran de amplio espectro podían complementarse entre ellos. Sin embargo, más tarde el uso rotacional de antihelmínticos de amplio espectro se utilizó como una manera de prevenir resistencia (Kaplan & Nielsen, 2010). Si bien el sistema a intervalo fue eficaz en su comienzo, el uso extensivo de este sistema ha sido responsable de la aparición de resistencia antihelmíntica (Kaplan, 2004; Francisco et al., 2012). Por otro lado, el control estratégico toma en cuenta el ciclo de vida del parásito y se desparasita a momentos particulares en el año. Si bien se toma en cuenta el ciclo de vida del parásito, otros factores como las cargas parasitarias, el nivel de eliminación de huevos y factores climáticos no son tomados en cuenta (Stratford et al., 2013).

El sistema que se recomienda en la actualidad, es el sistema de control selectivo o tratamiento dirigido por conteo fecal (Matthews, 2014). Este protocolo requiere del uso de pruebas cuantitativas de materia fecal para poder categorizar a los animales bajo criterios de niveles de diseminación. Tomando en cuenta ciclo

de vida y factores epidemiológicos de los parásitos, se desparasita a aquellos animales con cargas moderadas y altas de parásitos. A los animales con cargas parasitarias bajas o aparentemente inexistentes no se les administra el fármaco antihelmíntico. De esta manera, se preserva aquella población de parásitos en “refugia” (Zajac, 2012; Stratford et al., 2013; Matthews, 2014).

Refugia

El término “refugia” hace referencia a la proporción de la población de parásitos que no se expone al antihelmíntico utilizado y por ende no se ve afectada de ninguna manera por éste. Los parásitos en refugia son aquellos parásitos que al momento de una desparasitación se encuentran en uno de los siguientes tres lugares: en pastura, en la pared intestinal, y en aquellos caballos no seleccionados para tratamiento. El concepto de refugia es importante, ya que su rol en la prevención del desarrollo de resistencia es imprescindible (Van Wyk, 2001; Kaplan, 2004; Kaplan y Nielsen, 2010).

Resistencia: definición e historia

La disminución cuantificable de la eficacia de un compuesto químico sobre una población de parásitos se denomina resistencia (Reinemeyer, 2009). Se dice que existe resistencia en una cierta población de parásitos cuando en ésta existen mayores números de individuos tolerantes a un químico; se compara esto con una población normal de la misma especie de parásitos en el mismo estadio de desarrollo en la que la mayoría de los individuos serían susceptibles al mismo fármaco bajo las mismas condiciones de uso (ej. dosificación) (Vidyashankar et al., 2012). Por ende, “resistencia” es la capacidad de un parásito a tolerar un químico sin verse afectado y de pasar los genes que le permiten generar tolerancia a la siguiente generación de parásitos (Prichard et al., 1980; Coles et al., 2006). Este proceso genético en el cuál los alelos responsables del fenotipo resistente se acumulan en una población a consecuencia de selección por el uso de fármacos, es dinámico. La rapidez con la cuál este proceso ocurre depende de factores tanto del parásito como del huésped y de la utilización de fármacos (Vidyashankar et al., 2012).

Existen dos tipos de resistencia: intrínseca y extrínseca. En la resistencia intrínseca, el parásito logra tolerar el fármaco por falta de receptores o por alguna característica que imposibilita la penetración del fármaco y ejercer su efecto. En la resistencia extrínseca o adquirida, el parásito previamente susceptible logra tolerar el fármaco por medio de cambios genéticos, los cuales son heredables. Entre los mecanismos responsables del cambio genético están: mutaciones, amplificación génica, y transferencia génica (Márquez, 2003) Por lo general, los genes que codifican el fenotipo resistente, tienen frecuencias bajas; sin embargo, el uso indiscriminado de antihelmínticos selecciona rápidamente a aquellos parásitos cuyos genes permiten su supervivencia (Reinemeyer, 2009).

En el año 1950, el primer antihelmíntico de amplio espectro fue la fenotiazina y ya en años subsiguientes hubieron reportes de resistencia hacia el fármaco por parte del parásito de ovejas, *Haemonchus contortus*. En el año 1960, los ciatostomas equinos eran ya resistentes a la fenotiazina. Como se ha mencionado previamente, en el año 1961 el tiabendazol fue el primer benzimidazol disponible. Los benzimidazoles revolucionaron el mercado, sin embargo, entre 1970 y 1980 la resistencia de varias especies de nemátodos hacia los benzimidazoles se había dispersado mundialmente. En este período de tiempo se introdujeron nuevos antihelmínticos como los imidazotiazoles, tetrahidropirimidinas, y las lactonas macrocíclicas. Para 1980, los primeros reportes de resistencia multidroga fueron reportados, preocupando principalmente a la industria ovejera (Márquez, 2003; Kaplan, 2004).

En caballos, la resistencia de ciatostomas a los benzimidazoles tiene una prevalencia por encima del 75%. En Estados Unidos y el Reino Unido, 80% de las instalaciones ecuestres analizadas han probado tener resistencia a los benzimidazoles (Proudman & Matthews, 2000; Kaplan, 2004). Así mismo, entre los años 1990 y 2000, la resistencia a las sales de pirantel fue reportada (Nielsen et al., 2014b). Actualmente, casi la mitad de la población de ciatostomas es capaz de tolerar fármacos de la clase de tetrahidropirimidinas (Reinemeyer, 2012). Se pensaba que la resistencia hacia las sales de pirantel se debía al uso diario de

tartrato de pirantel; sin embargo, en lugares como en Europa, donde no se ha utilizado este régimen de prevención, también existe resistencia hacia estos fármacos (Peregrine et al., 2014). Hace unos pocos años la resistencia hacia las lactonas macrocíclicas era tan solo una proyección para el futuro (Kaplan, 2004). Actualmente, existen reportes de resistencia o sospecha de ésta hacia la ivermectina basados en resultados de pruebas de reducción de oviposición, períodos de reaparición de huevos disminuídos y pruebas críticas (descritas enseguida). Para la moxidectina también hay reportes basados en los mismos parámetros con excepción de resultados contundentes de pruebas de reducción de oviposición. El primer reporte de resistencia de ciatostomas a la moxidectina, se observó en Inglaterra en el año 2005 (Kaplan & Vidyashankar, 2012). En la siguiente tabla (Tabla 2), se encuentra un resumen de los lugares donde han sido reportados eventos de resistencia o sospecha de ésta a los benzimidazoles, tetrahidropirimidinas y lactonas macrocíclicas.

Tabla 2. Resistencia antihelmíntica en ciatostomas en el mundo (Peregrine et al., 2014)

Familia de Antihelmíntico	Países donde se ha reportado resistencia
Benzimidazoles	Australia, Brazil, Canadá, Dinamarca, Francia, Alemania, Italia, Noruega, República de Eslovaquia, Suecia, Suiza, Ucrania, Reino Unido, Estados Unidos
Tetrahidropirimidinas	Brazil, Canadá, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Italia, Noruega, Suecia, Suiza, Reino Unido, Estados Unidos
Lactonas Macrocíclicas	Brazil, Finlandia, Italia, Reino Unido, Alemania

Párametros y pruebas para medir resistencia

Para determinar resistencia, se utiliza la prueba de reducción de oviposición (FECRT: fecal egg count reduction test) la misma que no requiere equipo sofisticado y se puede realizar fácilmente (Kuzmina & Kharchenko, 2008). Esta prueba evalúa la eficacia del antihelmíntico contra los estadíos adultos de los ciatostomas en el lumen intestinal (Witzendorff et al., 2003). La eficacia de un antihelmíntico se traduce en su capacidad de disminuir la eliminacióm de huevos al medio ambiente tras su administración. Por ende, para esta prueba se toman

en cuenta los resultados de conteos fecales previos y posteriores al tratamiento antihelmíntico. Por lo general, el conteo fecal post-tratamiento se realiza 10 a 14 días después del tratamiento con el antihelmíntico. Para determinar eficacia de un antihelmíntico, se sugiere utilizar técnicas de conteo con una sensibilidad mínima de 25 huevos por gramo (Nielsen & Kaplan, 2010; Vidyashankar et al., 2012).

Si bien esta prueba es utilizada mundialmente, los límites que definen resistencia no han sido estandarizados (Nielsen et al., 2014b). De manera general, Kaplan et al., (2004) sugiere que los porcentajes obtenidos en la prueba de reducción de oviposición por debajo del 90% sugieren resistencia al antihelmíntico utilizado. Entre 80% y 90% se considera una sospecha de resistencia. Y valores por debajo del 80% determinan resistencia y por ende ineficacia del antihelmíntico utilizado. Sin embargo, varios reportes sobre resistencia han tomado en cuenta distintos límites para la consideración de resistencia (Nielsen et al., 2014b).

Entre otras pruebas para la detección de resistencia están las pruebas *in-vitro* y las pruebas moleculares. Las pruebas *in-vitro* incluyen la prueba de eclosión de huevos, la prueba de desarrollo larvario y la prueba de inhibición de migración larvaria. Si bien estas pruebas han sido utilizadas para la detección de resistencia en parásitos de pequeños rumiantes, por varias razones, su uso ha sido muy limitado y obsoleto para la determinación de resistencia en ciatostomas equinos. Por otro lado, las pruebas moleculares se han utilizado en la determinación de resistencia a benzimidazoles en parásitos de rumiantes (Coles et al., 2006; Matthews et al., 2011; Vidyashankar et al., 2012; Nielsen et al., 2014b).

Las pruebas que evalúan eficacia de un fármaco con exactitud son las pruebas críticas y las pruebas de eficacia controlada. Las pruebas críticas requieren el conteo total de parásitos muertos y vivos posterior a un tratamiento. Las pruebas de eficacia controlada son similares solo que también se utilizan animales control. Si bien estas pruebas son el real estándar dorado para la evaluación de eficacia, éstas requieren el sacrificio de los animales y no son prácticas aplicables a nivel de campo (Vidyashankar et al., 2012; Molento et al., 2012).

Otro parámetro que se toma en cuenta para evaluar resistencia es el período de reaparición de huevos (ERP: Egg Reappearance Period). Este período de tiempo es el tiempo que toma para que después de un tratamiento eficaz se vuelva a evidenciar presencia de huevos en las heces. Cada clase o compuesto de antihelmíntico tiene un período de reaparición diferente (Reinemeyer, 2009). En la tabla 3. se pueden apreciar los períodos de reaparición de huevos de ciatostomas para antihelmínticos de las tres clases de antihelmínticos comúnmente usados en equinos (AAEP, 2013; Reinemeyer, 2009).

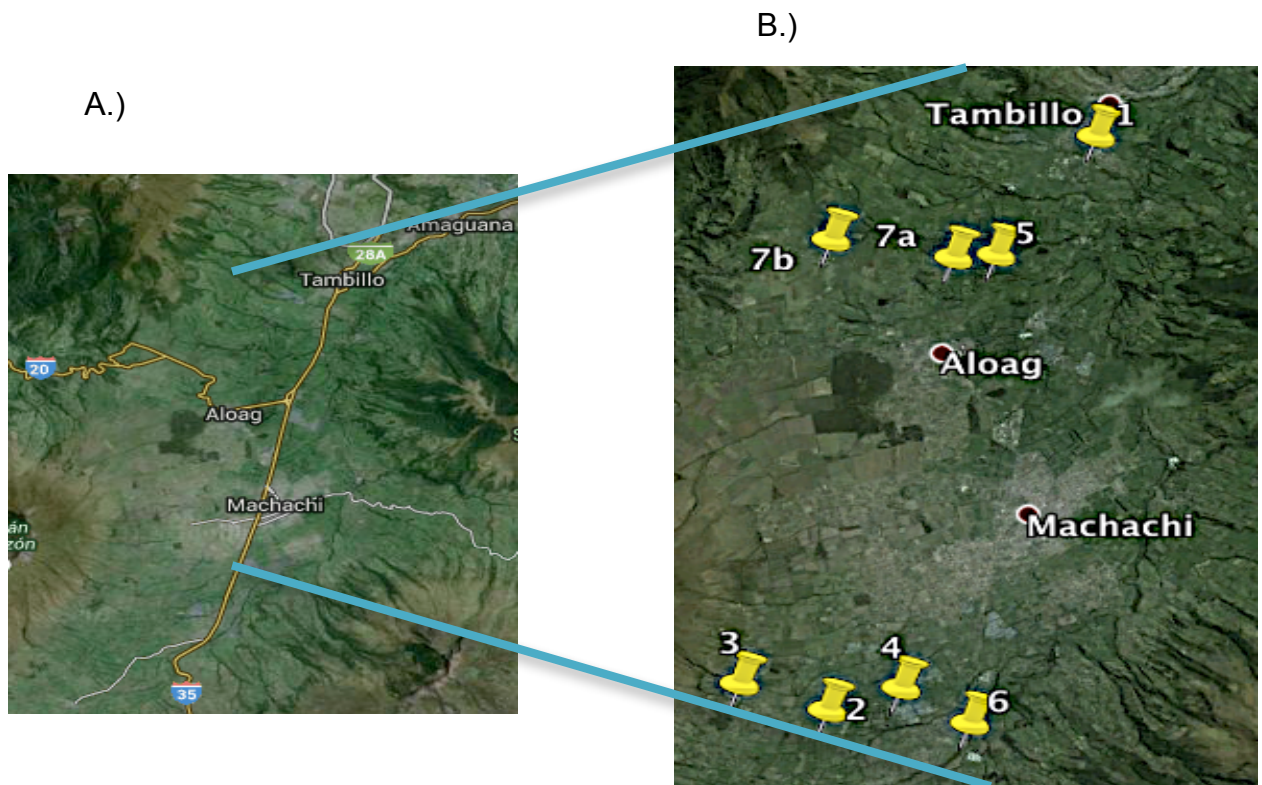
Tabla 3. Períodos de reaparición de oviposición para diferentes antihelmínticos (modificado de AAEP, 2013; Reinemeyer, 2009).

Antelmíntico	Período de Reaparición de Oviposición Actual
Fenbendazol/Oxibendazol	4-5 semanas
Pirantel	4-5 semanas
Ivermectina	6-8 semanas
Moxidectina	10-12 semanas

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de estudio

El estudio se realizó en siete propiedades ubicadas al Sur de Quito en Ecuador. Éstas se ubican en las zonas de Machachi, Tambillo, y Aloag en el cantón Mejía, provincia de Pichincha. La mayoría de las propiedades fueron haciendas que cuentan con actividad tanto ecuestre como ganadera. En el siguiente mapa (Mapa 1) se encuentra la ubicación de cada una de ellas.



Mapa 1. A.) Mapa del Sector de Estudio B.) Ubicación de las 7 propiedades participantes del estudio: 1. Unidad de Equitación y Remonta; 2. Umbría; 3. Sacha Potrerros; 4. EcoRoses; 5. Hualilahua de Jijón; 6. El Tambo; 7a. La Alegría (Casa de Hacienda en parte baja); 7b. La Alegría (Huairabamba en parte alta).

Material biológico

Los equinos fueron pre-seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: animales entre 2 y 16 años de edad en buen estado de salud, en pastoreo y destinados a cualquier clase de actividad. No hubo preferencias en

cuanto a raza ni sexo; sin embargo se descartaron aquellas yeguas con sospecha de preñez o en su defecto preñadas. De acuerdo a esto, se incluyeron un total de 117 equinos.

Una vez seleccionados los animales, con el fin de estandarizar al grupo y asegurar que la última desparasitación de los caballos seleccionados previo al estudio sea de al menos 8 semanas (AAEP, 2013), se administró un antihelmíntico común a todos los caballos a comienzos de Julio de 2014. Se utilizó una tetrahidropirimidina ya que este compuesto no estuvo involucrado en las pruebas de reducción. El producto implementado fue a base de pamoato de pirantel en pasta (Equintel® 130mg/ml) a una dosis de 6.6 mg/Kg. No hubo ninguna alteración con respecto al manejo de los caballos posterior a la desparasitación inicial.

A mediados de Septiembre del 2014, al menos 60 días posterior a la primera desparasitación, se realizaron conteos fecales basales de los 117 animales y se seleccionaron de forma definitiva aquellos animales cuyos conteos fecales estaban por encima de 200 huevos por gramo de heces. El estudio se realizó con un total de 54 equinos: machos y hembras de distintas edades y disciplinas (Tabla 4). El rango de edad fue de 2 a 15 años (Gráfico 1). En el gráfico 2. se puede apreciar la distribución de conteos fecales basales de los 54 equinos seleccionados para la fase experimental del estudio.

Tabla 4. Animales de estudio: total de equinos, sexo, edad y disciplinas

Total de Animales	Yeguas	Machos	Edades	Disciplinas
54	24	30	2-15 años	Polo, Paseo, Endurance, Trabajo, Placer

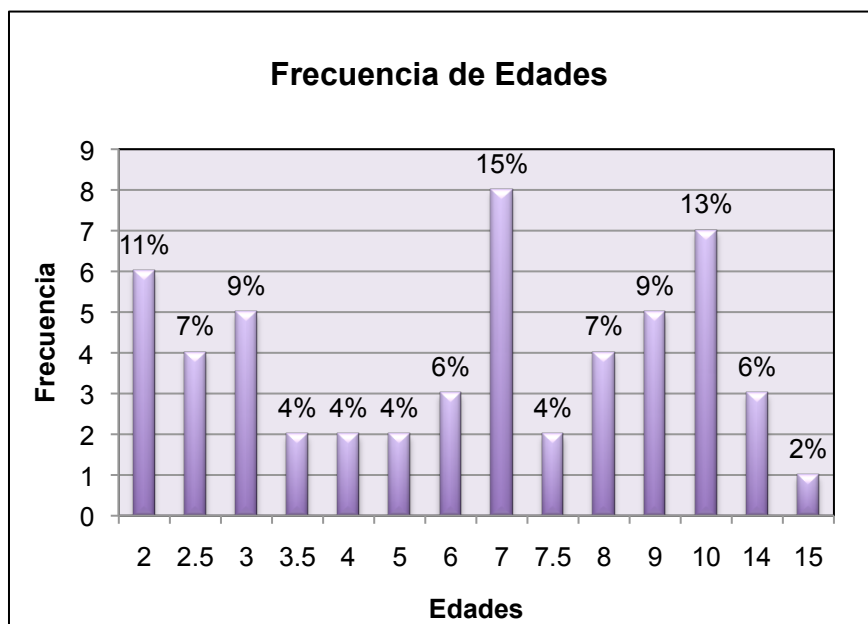


Gráfico 1. Frecuencia de edades en población de equinos estudiada (n=54)

Diseño experimental

Grupos experimentales.

Una vez seleccionados los equinos de estudio, se establecieron tres grupos: grupo control (CTRL), grupo febendazol (FBZ) y grupo ivermectina (IVM). Los animales se distribuyeron en los grupos de forma completamente aleatoria; sin embargo se procuró que en cada instalación haya por lo menos un animal en cada grupo. Los tratamientos fueron administrados una vez determinados los integrantes de cada grupo. Para dosificar, se utilizó una cinta zootécnica para estimar el peso de los animales.

Grupo Control (CTRL)(n=18):

Los caballos en el grupo control fueron tratados con un placebo a base de yogurt saborizado.

Grupo Febendazol (FBZ) (n=17):

A los caballos en el grupo febendazol, se les administró febendazol (Meltra Oral®, 100 mg/ml) a una dosis de 7.5 mg/Kg.

Grupo Ivermectina (IVM)(n=19):

El grupo ivermectina, fue tratado con ivermectina/ prazicuantel (Ecuangel®, 12mg/ml) a una dosis de 0.2 mg/Kg.

En la tabla 5. se indica el número de animales de cada propiedad asignado a cada grupo experimental.

Tabla 5 Total de caballos por propiedad en cada grupo experimental (n=54)

Propiedad	Control	Febendazol	Ivermectina
1	1	1	1
2	2	1	2
3	2	2	3
4	2	3	2
5	1	0	1
6	3	4	3
7	7	6	7
Total	18	17	19

Tiempos de muestreo.

El conteo fecal basal se realizó pocos días previos a la administración del tratamiento, por lo que el valor del conteo se considera basal o del día 0, sin embargo el día 0 corresponde al día en que se administró el antihelmíntico a cada grupo. Posterior a esto, se muestrearon y se hicieron conteos fecales estrictos al día 14, 28, 42, 56 y 80.

Obtención de Muestras Fecales.

Para todos los conteos fecales realizados en el estudio, la recolección de muestras fue realizada de la misma manera. Se obtuvieron las muestras directamente del recto de los animales con ciertas excepciones en las que los animales defecaron justo al momento de muestrear o defecaron en pesebreras limpias dónde se los albergaba para el muestreo. Para la toma de muestras del recto se utilizaron guantes ginecológicos y aceite de vaselina. Para interferir de forma mínima con la muestra, se procuró solo mojar dos dedos con vaselina para

así facilitar la obtención de la muestra. Dependiendo de las instalaciones, del carácter, del comportamiento, y del riesgo que el animal exhibía se tomó la decisión del uso de mangas, cuerdas, o restricción física. Una vez obtenida la muestra, se la colocó en una funda plástica o se la dejó en el mismo guante utilizado. Antes de cerrar la funda con la muestra contenida se procuró sacar todo el aire dentro de ella para así minimizar la eclosión de huevos. Se mantuvo las muestras en un “cooler” durante el día de recolección para ser refrigeradas y mantenidas posterior al muestreo. El tiempo máximo entre la recolección de muestras y los análisis fue de 72 horas.

Análisis de muestras fecales / conteos fecales.

Se realizaron un total de 387 conteos fecales para el estudio. Se utilizó la técnica McMaster Modificada descrita por Zajac (2012) y se detalla a continuación.

Para cada muestra y conteo fecal se repitieron los siguientes pasos. Para obtener una muestra de 4 gramos de la muestra original, se dividió la muestra existente y se procuró obtener heces de una zona que no tuvo contacto con aire o vaselina. Se colocó la muestra en una taza de plástico pequeña y se hicieron múltiples pesajes hasta obtener una muestra de 4 gramos. Posterior a esto, se añadió 26 mL de solución de flotación (sulfato de magnesio o sales Epson (331g/L); Cardona, 2005). Una vez añadida la solución, se mezcló con un palo de madera hasta que la solución y las heces se hayan homogenizado. Posterior e inmediatamente después se filtró la mezcla en una gasa y el filtrado se colocó en un tubo de ensayo limpio. Con un gotero o una jeringa de insulina se obtuvo el líquido del tubo y se llenó la cámara de McMaster. Sí hubieron burbujas de aire de gran tamaño tomando espacio en la cámara, se descartó el líquido y se volvió a llenar la cámara procurando la ausencia de aire. Una vez cargada correctamente, se dejó reposar la cámara por 5 minutos previo al análisis microscópico.

Para el análisis microscópico, se enfocó con el objetivo de 4X sobre el plano en el que se veían burbujas de aire pequeñas y la grilla de la cámara. Para

el conteo se utilizó el objetivo 10X. Se contaron los huevos de *Strongylus* spp. que se encontraron dentro de los recuadros formados por la grilla. No se contaron los huevos que se encontraron sobrepuestos en los filos de ella. Se contaron los huevos en ambas grillas de la cámara y se obtuvo el total de huevos sumando la cantidad en cada una de ellas. Para calcular la cantidad de huevos por gramo de heces se utilizó la siguiente fórmula:

Fórmula 1. Huevos por gramo de heces (HPG)

$$\text{HPG} = \left(\frac{\text{total de huevos contados} \times \text{vol. total}^*}{\text{vol. contado}^{**}} \right) / \text{gr. de heces}$$

**el volumen total considera los gramos de heces utilizados y la cantidad de solución de flotación implementada. En todos los casos el volumen fue de 30 mL ya que se utilizaron 4 gramos de heces y 26 mL de solución de flotación.*

***el volumen contado se refiere al volumen de la cámara en la que se cuentan los huevos. Cada grilla representa 0.15mL de solución por ende, como se cuentan dos, el volumen contado es de 0.3mL.*

Análisis estadístico

Una vez obtenidos los conteos fecales en los distintos tiempos, se utilizó la prueba de Shapiro Wilk para ver el comportamiento de los datos. Ya que los datos mostraron una distribución no paramétrica, las pruebas estadísticas y resultados se basaron en la información proporcionada por la mediana de los datos.

Se utilizó la prueba de Mann Whitney para realizar la comparación de los conteos fecales en el día basal entre los tres grupos experimentales. La prueba permitió saber si los tres grupos fueron homogéneos antes de ser tratados experimentalmente.

Para la prueba de resistencia se utilizaron medianas de conteos fecales y la mediana de porcentajes de reducción para cada grupo. Los límites de confianza se obtuvieron utilizando bootstrapping no paramétrico tomando en cuenta las medianas de los porcentajes de reducción. Cabe recalcar que estas técnicas

estadísticas para evaluar eficacia según las pruebas de reducción se clasifica como frecuentista, a diferencia de los métodos Bayesianos que también se utilizan en los análisis de pruebas de reducción de oviposición (Vidyashankar et al., 2012).

Finalmente, para establecer el período de reaparición de oviposición para cada uno de los tratamientos se hicieron pruebas pareadas de rangos con signos de Wilcoxon entre conteos fecales del mismo grupo en los distintos tiempos de muestreo. También se graficaron los conteos fecales utilizando diagramas de cajas y bigotes y se hicieron comparaciones entre medianas.

Prueba de reducción de oviposición

El valor del porcentaje de reducción de oviposición compara los conteos fecales basales previos al tratamiento antihelmíntico con los conteos 10 a 14 días posterior a éste. En este estudio, el conteo fecal post-tratamiento se lo realizó exactamente después de 14 días. Se utilizó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de reducción:

Fórmula 2. Porcentaje de reducción de oviposición (PRO)

$$\text{PRO} = \left(\frac{[\text{HPG Basal} - \text{HPG 14 días postT}]}{\text{HPG basal}} \right) \times 100$$

Para minimizar el riesgo de sobreestimación de resistencia se tomó en cuenta solamente los huevos que se atribuyen fueron de ciatostomas. Para esto al valor de huevos por gramo que se obtuvo, se lo multiplicó por 0.95 para obtener el 95% de huevos. El 5% restante de huevos no se tomó en cuenta ya que se atribuye que fueron de estrongídeos grandes (Zajac, 2012; AAEP, 2013; Peregrine et al., 2014).

Así mismo, para detectar resistencia se utilizaron los límites utilizados para diagnosticar resistencia en ovejas descrito por la World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology en Coles et al., (1992) y utilizado en un

estudio por Canever et al., (2013). Si la mediana del porcentaje de reducción se encontró por encima del 95% y el límite de confianza por encima de 90% se consideró que los parásitos fueron sensibles al antihelmíntico y que el fármaco fue efectivo. Si una de las dos condiciones sugerían eficacia reducida, se concluyó presencia de resistencia al fármaco utilizado.

Determinación de período de reaparición de oviposición

Para establecer el período de reaparición de oviposición, se tomaron en cuenta todos los conteos fecales post-tratamiento y se los comparó al conteo fecal pre-tratamiento.

Se tomó en cuenta que el período de reaparición de huevos es un intervalo de tiempo cuyo comienzo lo establece el tratamiento (Día 0). El parámetro final que define el intervalo es el momento en que existe una oviposición significativa de huevos de ciatostomas. Esto ocurre en el momento en que un conteo post-tratamiento iguala el 20% o más del conteo fecal basal (Tarigo Martinie et al., 2001; Brady et al., 2009; Reinemeyer, 2009). Para poder ubicar el momento de reaparición se consideraron las relaciones entre medianas de conteos fecales post-tratamiento y pre-tratamiento tomando en cuenta la siguiente fórmula. Por ende, el período de reaparición de oviposición es el intervalo entre el “día 0” y el “momento de reaparición”.

Fórmula 3. Comparación entre conteos fecales post-tratamiento y pre-tratamiento para establecer el intervalo de reaparición de oviposición

$$\text{Momento de Reparación de Huevos} = (> o = 0.20 \times \text{HPG basal}) = ((\text{HPG PostT} / \text{HPG basal}) \times 100)$$

RESULTADOS

Conteos fecales previo al tratamiento experimental

Se compararon los valores de los conteos fecales basales (día 0) entre el grupo control, grupo febendazol y grupo ivermectina. No hubo diferencia significativa entre grupos por lo que se los consideró grupos homogéneos. En la tabla 6. se pueden comparar las medianas de los conteos basales o conteos fecales pre-tratamiento para cada grupo.

La distribución de los conteos fecales de los 54 animales que se incluyeron en el estudio antes de ser tratados con los respectivos tratamientos experimentales puede ser apreciada en el gráfico 2. Así mismo, se resalta que los conteos fecales en el tiempo basal pertenecieron a equinos con conteos fecales por encima de los 200 HPG. Se determinó que los conteos fecales basales tuvieron una distribución no paramétrica.

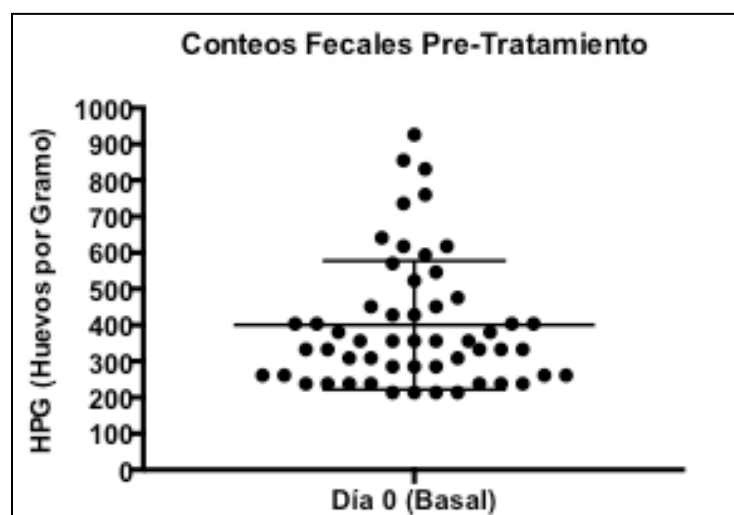


Gráfico 2. Conteos fecales previos a tratamiento experimental en 54 caballos

Eficacia antihelmíntica: prueba de reducción de oviposición

El grupo control, no demostró diferencia significativa entre los conteos fecales previos al tratamiento y los conteos fecales posteriores al tratamiento ($P=0.24$).

El grupo febendazol tampoco demostró diferencia significativa entre los conteos fecales pre-tratamiento y post tratamiento. Sin embargo, tomando en cuenta el valor de significancia ($P=0.09$), se puede sugerir una tendencia de disminución entre los conteos fecales pre-tratamiento y los conteos fecales post-tratamiento para este grupo.

Tanto el porcentaje de reducción como el límite de confianza mínimo para el grupo control y el grupo febendazol, están por debajo de aquellos límites porcentuales indicativos de sensibilidad antihelmíntica. El intervalo de confianza para el grupo febendazol es mayor a aquel intervalo de confianza para el grupo control. El patrón de disminución que se sugiere con el valor de significancia ($P=0.09$) se refleja en un porcentaje de reducción mayor a aquel del control.

En el grupo ivermectina se observó una disminución significativa entre los conteos fecales obtenidos previos al tratamiento y los conteos fecales obtenidos posterior al tratamiento ($P=0.0001$). El patrón que se observa con los valores de los conteos fecales sugiere una disminución total de huevos posterior al tratamiento. El porcentaje de reducción y límite mínimo de confianza de 100% indica que la ivermectina está dentro de los parámetros sugestivos de sensibilidad antihelmíntica. El detalle de información para la prueba de reducción de conteos fecales en los grupos control, febendazol e ivermectina se resume en la Tabla 6.

Tabla 6. Conteos fecales pre-tratamiento y post-tratamiento; (% de reducción) e intervalos de confianza (n=54)

Tratamiento	Conteo Fecal PreT	Conteo Fecal PostT	% de Reducción	Intervalo de Confianza (95%)
Control (n=18)	333	368	-16.7	-69.8-21.8
Febendazol (n=17)	380	261	18.2	0 a 62.9
Ivermectina (n=19)	356	0	100	100 a 100

Duración de períodos de reaparición de oviposición

Al comparar los conteos fecales del día 0 (basal) con los conteos obtenidos en los días 14, 28, 42, 56 y 80 no se observaron diferencias significativas entre tiempos tanto para el grupo control (Gráfico 3) como para el grupo febendazol (Gráfico 4). Los dos grupos mantuvieron conteos constantes a través del tiempo en el lapso de 80 días sin verse afectados ya sea por el tratamiento con placebo o el tratamiento con febendazol.

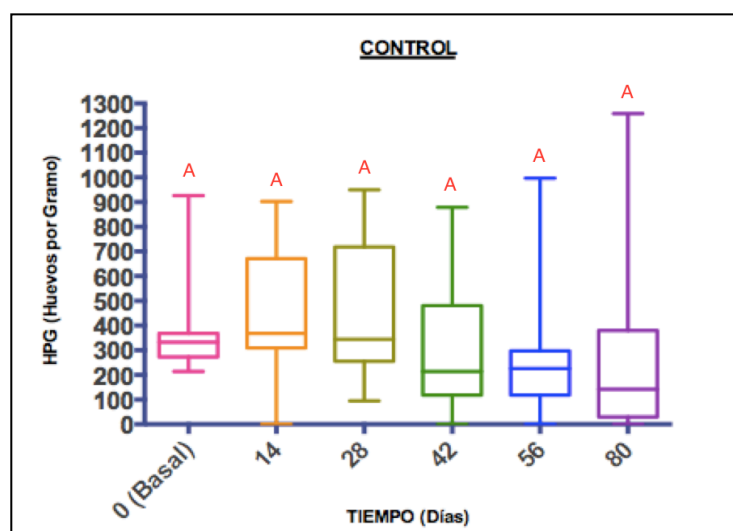


Gráfico 3. Conteos fecales en caballos del grupo control en los días 0 (basal), 14, 28, 42, 56 y 80 (n=18) ****Letras diferentes indican diferencias significativas entre tiempos ($P < 0.05$).**

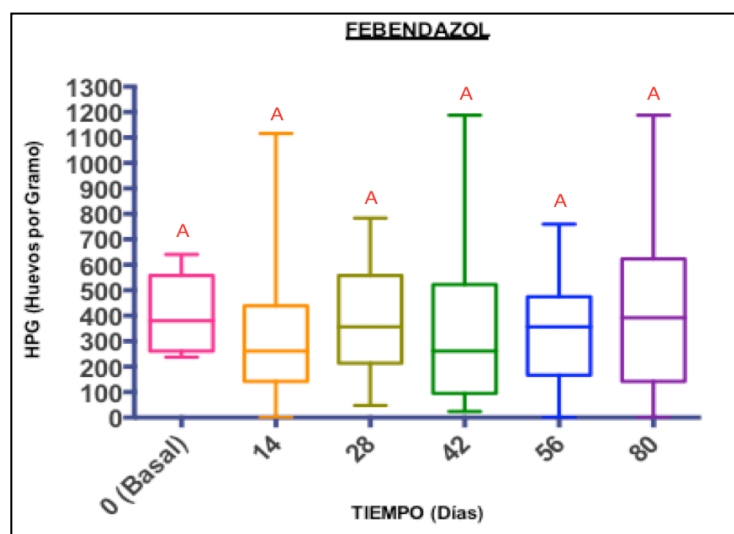


Gráfico 4. Conteos fecales en caballos del grupo febendazol en los días 0 (basal), 14, 28, 42, 56 y 80 (n=17) ** Letras diferentes indican diferencias significativas entre tiempos ($P < 0.05$).

Para el grupo de caballos tratados con ivermectina el patrón de conteos fecales entre el día basal y el día 80 (Gráfico 5) fue muy distinto a aquellos patrones observados en los grupos control y febendazol. Se contaron 356 huevos por gramo en el día basal para posteriormente presentar una disminución total de huevos en el día 14. El bajo recuento de huevos por gramo en el día 14 se mantiene similar hasta el día 42. A partir del día 42 hasta el día 80 se observó un incremento significativo de huevos ($P < 0.05$) con respecto al día 14. Estas diferencias entre tiempos posterior al día 42 se traducen en un aumento constante de los conteos fecales.

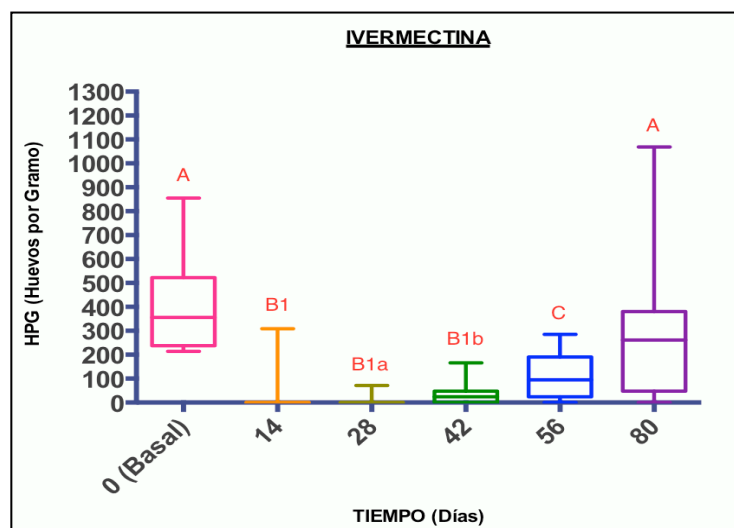


Gráfico 5. Conteos fecales en caballos del grupo ivermectina en los días 0 (basal), 14, 28, 42, 56 y 80 (n=19) ** Letras diferentes indican diferencias significativas entre tiempos ($P < 0.05$)

Tomando en cuenta que existió un incremento de huevos desde el día 42 y que el período de reaparición de huevos se establece cuando los conteos fecales se acercan al conteo basal en un 20% o más, se compararon las medianas de los tiempos 42, 56 y del día 80 con la mediana del conteo fecal pre-tratamiento utilizando la fórmula 3. En la tabla 7. se encuentran las medianas de los conteos fecales del grupo ivermectina para cada tiempo y se incluye la relación porcentual con respecto al conteo fecal basal.

Tabla 7. Relación entre conteos fecales post-tratamiento y basales en caballos tratados con ivermectina (n=19)

Tiempo	Día 0	Día 14	Día 28	Día 42	Día 56	Día 80
Conteos fecales (HPG)	356	0	0	24	95	261
Porcentaje con respecto a día basal	100%	0%	0%	6%	27%	73%

Se observa que en el día 42, la mediana de los conteos fecales alcanzó tan solo un 6% del conteo fecal basal. En el día 56, el conteo fecal sobrepasa el 20% del tratamiento basal con un 27%. El día 80, los conteos fecales no significativamente diferentes a los conteos fecales del día basal alcanzaron un 73% de éste. Tomando en cuenta que el período de reaparición es el intervalo de tiempo entre el día de tratamiento (Día 0) y el momento de en el que los conteos fecales igualan o sobrepasan el 20% del conteo fecal basal, se determinó que el período de reaparición de huevos para la ivermectina estuvo entre las 6 y 8 semanas.

Sistemas de manejo y protocolos de desparasitación

Junto con los resultados anteriores, se obtuvo información descriptiva sobre el manejo de desparasitación en las 7 instalaciones involucradas en el estudio basado en información de frecuencia, dosificación, protocolos y fármacos utilizados en el pasado. Se obtuvo también, información sobre el manejo general del sistema de rotación de potreros.

En las 7 instalaciones nunca se han implementado los conteos fecales como indicación para la desparasitación. Por lo general, los caballos se desparasitan a intervalo, cada 3 a 4 meses con algunas excepciones en la que se desparasita de forma semestral. Se ha utilizado un protocolo rotativo de desparasitación en 4 de las 7 instalaciones. En la mayoría de éstas, se dosifica de manera empírica en la que se infiere el peso del animal y se dosifica de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial con jeringas dosificadas; solo en un lugar se utiliza la cinta zootécnica para estimación de peso.

La rotación de potreros se hace de distinta manera en cada instalación; sin embargo, en todas depende del tamaño del potrero, el número de animales, y la temporada. En una instalación la rotación de potreros se hace de acuerdo a la rotación del ganado en la que los caballos se utilizan para el “repelado” del potrero. Los tiempos de permanencia en un potrero específico varían de 2 días hasta 2 meses dependiendo de la instalación. En ninguno de los lugares analizados se recoge la materia fecal del potrero como sistema de higiene. En la

tabla 8. se resume la información de manejo de las 7 instalaciones e incluye los fármacos que se utilizan en sus protocolos de desparasitación.

Tabla 8. Manejo de desparasitación y pasturas en las 7 propiedades participantes del estudio

Desparasitación					Pasturas
Propiedad y no. de caballos	Protocolo	Dosificación	Uso	Fármacos	Rotación
1. 3 caballos	Intervalo c/3 meses	Empírico	No Rotativo	-Doramectina -Ivermectina -Febendazol	-c/semana
2. 5 caballos	Intervalo c/3 meses	Empírico	Rotativo	-Doramectina -Ivermectina -Febendazol*	-c/2 meses -potreros pequeños menos de 2 meses
3. 7 caballos	Intervalo c/3 meses	Empírico	No Rotativo	-Ivermectina	-c/mes
4. 7 caballos	Intervalo -Caballos de polo: c/4 meses -Otros: c/año -Potros:c/3 meses	Empírico	Rotativo	-Ivermectina, -Tiabendazol (Equivet TZ) _**	-c/4-7 días -depende de tamaño de potrero, número de animales, y temporada
5. 2 caballos	Intervalo c/6-8 meses***	Peso con cinta	Rotativo	-Ivermectina, -Febendazol	-2-3 días luego del rejo
6. 10 caballos	Intervalo c/6 meses	Empírico	Rotativo	-Ivermectina Benzimidazol ****	-c/4-5 días -depende de tamaño y húmedad
7. 20 caballos	Intervalo c/3-4 meses	Empírico	Rotativo	-Febendazol, -Ivermectina *****	-c/3-4 días

*Se utilizó 1 vez hace 3 años
 ** Se utiliza otro fármaco; dueño no identifica la marca ni el compuesto
 *** No siempre; cada 6 a 8 meses; cuando hay oportunidad
 **** Se presume que el fármaco es un Benzimidazol
 ***** La rotación consiste en utilizar Febendazol 2 veces seguidas y 1 vez la Ivermectina

DISCUSIÓN

El estudio realizado pretendió evaluar la eficacia y por ende determinar si existe resistencia a febendazol o ivermectina en caballos de Machachi, Ecuador. Las pruebas de reducción de oviposición indican que para el febendazol se encontró presencia de resistencia al fármaco. Para la ivermectina tanto la prueba de reducción de oviposición como la determinación del período de reaparición infieren que no hay resistencia en ciatostomas equinos a la ivermectina. Por ello, se aceptó la hipótesis con respecto al caso del febendazol pero se rechazó para la ivermectina.

Pruebas de reducción de oviposición

Para el grupo febendazol, tanto la mediana del porcentaje de reducción (18.2%) como el límite de confianza mínimo (-9.1%) estuvieron por debajo de los límites (95%; 90%), lo que indica que la eficacia del febendazol estuvo reducida. En sí, para el grupo febendazol, el intervalo de confianza estimó que el porcentaje de reducción se encontró entre 0% a 62.9%. El límite máximo de confianza estuvo así mismo por debajo del 90%. Por esto, se infirió que el porcentaje de reducción estaría por debajo de los límites de sensibilidad 95% de las veces que se haría un muestreo. Así mismo, un límite de confianza mínimo de 0% sugiere que la eficacia podría así mismo estar reducida en un 100%. Los resultados obtenidos tanto para el porcentaje de reducción como para los límites de confianza son indicios claros de la presencia de resistencia en ciatostomas al febendazol.

El porcentaje de reducción o la eficacia del febendazol en este estudio fue similar a los resultados obtenidos por Kaplan et al. (2004), dónde el porcentaje de reducción promedio obtenido de 227 caballos tratados con febendazol en haciendas de Carolina del Sur, Georgia, Florida, y Louisiana fue de 24.8%. Los reportes de resistencia hacia los benzimidazoles, especialmente hacia el febendazol son comunes en Europa. Al respecto, en Dinamarca, se encontraron porcentajes de reducción entre -101% y 80%. Se sugirió que la evidente

resistencia al febendazol probablemente se deba a la alta frecuencia de uso del antihelmíntico (5.3 a 7 veces por año; Bjorn et al., 1991 citado en Brady et al., 2009). Paralelamente, Molento et al., (2008), obtuvieron resultados preocupantes para la industria equina en Brasil, ya que se evidenció por primera vez resistencia (multidroga) a las tres familias de antihelmínticos utilizados en caballos. En particular para febendazol el porcentaje de reducción fue de 18% al igual que en el presente estudio, dónde el porcentaje de reducción fue de 18.2%. Adicionalmente, otros estudios en Latinoamérica dónde se ha reportado resistencia hacia el febendazol y en los cuales se determinaron porcentajes bajos de reducción de oviposición, se encontraron en Brasil (Luz Pereira et al., 1994; Otto et al., 2008; Canever et al., 2013) y Chile (von Witzendorff et al., 2003) Por lo tanto, tan solo tomando en cuenta los resultados para las pruebas de reducción de oviposición para el grupo febendazol en este estudio y comparándolo con resultados obtenidos en otros estudios, se establece que en Machachi, Ecuador los patrones de resistencia hacia el febendazol son parecidos a los patrones mundiales de resistencia hacia los benzimidazoles.

Los resultados del presente estudio contrastan con aquellos del estudio llevado a cabo por Kyvsgaard et al., (2011) en El Sauce, Nicaragua. En ese estudio se obtuvo un porcentaje de reducción para febendazol del 94%. Según los límites establecidos en su metodología, se consideró que no existe resistencia, ya que el porcentaje de reducción no estuvo por debajo de un límite de 80%. La presunta susceptibilidad de los parásitos al febendazol es inesperada, ya que la resistencia a los benzimidazoles está ampliamente distribuida a nivel mundial (Peregrine et al., 2014). Sin embargo, Kyvsgaard et al., (2011), indican que el uso de antihelmínticos en Nicaragua se ve limitado por temas de contexto social y económicos. Según el presente estudio en Machachi, Ecuador, donde se sugiere que existe resistencia al febendazol, tanto el acceso como el uso de antihelmínticos no es limitado, dato que se puede evidenciar en la tabla 8. donde el uso de antihelmínticos en muchas de las propiedades analizadas se basa en protocolos de control parasitario a intervalo. Según Kaplan y Nielsen (2010), indican que este tipo de protocolos son recomendaciones antiguas, que no

deberían aplicarse en el presente, ya que para evitar que se desarrolle más resistencia el uso de antihelmínticos debe ser limitado.

Otra observación que se puede hacer en la tabla 8, es que en la mayoría de propiedades se estima el peso de los animales de manera empírica al momento de dosificar un antiparasitario. El riesgo de esta práctica es que el peso del animal sea subestimado y por ende subdosificado. Se debe tomar en cuenta que el uso frecuente y la subdosificación de un fármaco son factores que contribuyen al desarrollo de resistencia en una población de parásitos (García et al., 2013). Al momento de administrar un antihelmíntico, se debe tener cuidado ya que otra manera de que un animal reciba dosis subterapéuticas del fármaco es tras la pérdida de producto al momento de administrarlo (Brady et al., 2009), lo cual puede ocurrir especialmente cuando se administran productos orales. En la propiedad donde se muestreó el número más alto de caballos del estudio (n=20/54) y en dónde 6 caballos de éstos fueron administrados febendazol, se constata que se hace tratamientos a intervalo rotando febendazol e ivermectina y se dosifica de manera empírica (Tabla 8). El esquema de rotación incluye el uso de febendazol 2 veces cada 3 a 4 meses seguidas por una administración de ivermectina lo que equivale a 2-3 tratamientos al año con febendazol. Cabe recalcar que en esta propiedad alrededor de 40 caballos más conviven con aquellos que fueron muestreados, por lo que se infiere que el nivel de resistencia a febendazol en la propiedad es alto. Por lo tanto, la evidencia de resistencia de ciatostomas a febendazol en el presente estudio, conlleva a sugerir que el uso frecuente, no selectivo y posiblemente subterapéutico de benzimidazoles son las causas probables de su presencia en Machachi, Ecuador.

Los resultados a la prueba de reducción de oviposición para la ivermectina demostraron que la ivermectina mantuvo su eficacia en un 100% ya que tanto la mediana del porcentaje de reducción como el límite mínimo de confianza estuvieron en 100%. El resultado obtenido en este estudio es muy similar a aquellos resultados reportados en varios estudios llevados a cabo en Estados Unidos (99.9% eficacia ; Kaplan et al., 2004), Australia (99.9%; Pook et al., 2002); Italia (Traversa et al., 2007), y Suecia (>99.9%; Osterman Lind et al., 2007). Así

mismo, Klei et al., (2001) evaluaron la eficacia de la ivermectina con pruebas críticas en 20 ponies sin hallarse indicios de resistencia al fármaco. Sin embargo, todos estos estudios y los resultados del estudio presente, contrastan con reportes recientes en los que se reportan indicios o confirmación de resistencia a la ivermectina. En Finlandia (Nareaho et al., 2011), Italia (Milillo et al., 2009; Traversa et al., 2009), Brasil (Molento et al., 2008; Canever et al. 2013), Alemania y el Reino Unido (Traversa et al., 2009) se ha reportado un porcentaje de reducción por debajo de los límites pre-establecidos en las metodologías de cada uno de estos estudios. Según Molento et al., (2012), datos no publicados en el 2009, evidenciaron que en Brazil, la eficacia de la ivermectina fue tan solo del 87%. De esta manera, comparando los resultados del presente estudio con otros, se sugiere que en Machachi, Ecuador todavía no existe resistencia a la ivermectina y que su eficacia se mantiene.

La detección de signos tempranos de resistencia hacia las lactonas macrocíclicas es de suma importancia, ya que una vez detectada se pueden tomar medidas de prevención para preservar su eficacia (von Samson-Himmelstjerna, 2012). Sin embargo la mayoría de veces, el desarrollo temprano de resistencia pasa desapercibido hasta que éste sobrepase su umbral y la condición de resistencia se vuelva clínicamente evidente (Molento et al., 2012). Vidyashankar et al., (2012), explica, que hacer una inferencia precisa sobre la disminución de eficacia de un fármaco, especialmente en la etapa temprana del desarrollo de resistencia, es difícil debido a que la información que provee la prueba de reducción de oviposición, está sujeta a múltiples factores de variabilidad de origen biológico, de manejo y de técnica de diagnóstico. Se ha determinado que diferencias de raza, sexo, uso, condiciones de manejo, estado de salud, diferencias espaciales (propiedades diferentes), tiempos de colección variables y microclimas dependientes de lugar, son todos factores de variabilidad que afectan los resultados de una prueba de eficacia (Vidyashankar et al., 2012). Cabe recalcar que todos estos factores estuvieron presentes en el estudio. Suponer que un resultado que muestra eficacia reducida se debe a resistencia y no a factores de variabilidad o viceversa, se debe hacer con precaución. Además se toma en cuenta que para que la prueba de reducción de oviposición pueda

detectar resistencia, 25% de los parásitos de una población deben ser resistentes (Matthews et al., 2012).

Cuando se obtiene un valor de eficacia para un fármaco, se debe tomar en cuenta que éste depende de los valores de los conteos fecales obtenidos previo y posterior al tratamiento (von Samson-Himmelstjerna, 2012). Según Vidyashankar et al., (2012), el conteo fecal de un caballo en particular varía en un lapso de tiempo corto (11 días), por lo tanto los valores que se obtienen en conteos fecales deberían ser descritos en términos de una distribución de probabilidad mas no como un valor fijo. Entonces, los resultados de una prueba de reducción de oviposición dependen de las variaciones en los conteos fecales del mismo hospedero (Miller et al., 2006 citado en Denwood et al., 2010; Vidyashankar et al., 2012; Nielsen, 2014). Al comparar resultados de eficacia, se debe tomar en cuenta la variabilidad para así no cometer errores al momento de interpretarlos. (Denwood et al., 2010; Vidyashankar et al., 2012). Según Nielsen (2014), para cualquier conteo fecal obtenido se debería interpretar tomando en cuenta el resultado +/- 50% del mismo; esto quiere decir que si el conteo fecal es de 200 HPG, se toma en cuenta que el conteo fecal puede estar en un rango entre 100 y 300 HPG.

La sensibilidad de la prueba de reducción de oviposición es baja (Matthews et al., 2012). Si bien los factores de variabilidad técnicos pueden ser reducidos manteniendo una técnica consistente y bien realizada al momento de procesar conteos fecales como lo estipula Nielsen, (2014), siempre existen factores de variabilidad inherentes e inevitables. La pérdida de huevos en el muestreo, procesamiento y almacenamiento de las muestras son algunos de estos factores (Nielsen et al., 2010). Como consecuencia, en una muestra fecal se toma en cuenta una disminución del 30% del total de los huevos (Vidyashankar et al., 2012). Así mismo, la ausencia de una distribución uniforme de huevos en las heces (Lester et al., 2012 citado en Matthews, 2014) y en la solución de flotación son también factores de variabilidad que afectan tanto el resultado de un conteo fecal como los resultados de todas las pruebas que se basan en el análisis cuantitativo de huevos (Vidyashankar et al., 2012).

Por esto se debe tomar en cuenta que un conteo fecal puede subestimar la cantidad real de huevos en una muestra fecal. Esto quiere decir que al momento de realizar una prueba de reducción de oviposición, un conteo fecal post-tratamiento con valor de cero, no significa que exista eficacia del 100% del fármaco, ya que no todos los huevos pudieron ser recuperados en la muestra para su conteo (Vidyashankar et al., 2012). Según Nielsen, (2014) y Matthews (2014), se debe enfatizar la importancia de la sensibilidad de la técnica a ser utilizada cuando se van a hacer pruebas de reducción de oviposición, ya que para una prueba de reducción se quiere contar el menor número de huevos posibles, para así no sobre-estimar la eficacia de un fármaco ocupado. El uso de una prueba como FLOTAC tiene una sensibilidad de 1 huevo por gramo por lo cuál se recomienda esta técnica cuando se quiere detectar resistencia de un antiparasitario en un predio o propiedad pecuaria. En el presente estudio, la técnica utilizada tuvo una sensibilidad mínima de 25 huevos por gramo, lo cuál indica que cualquier valor por debajo de 25 huevos no se pudo determinar y se diagnosticó como 0 huevos por gramo. Por ende, en este estudio, la detección temprana de desarrollo de resistencia a la ivermectina pudo haber sido pasada por alto a causa de factores que afectan la exactitud de las pruebas utilizadas.

Debido a que la eficacia obtenida con pruebas de reducción de oviposición puede ser tan variable, se recomienda sacar conclusiones cuidadosas cuando uno evalúa cambios en la eficacia de un fármaco (Denwood et al., 2010; Vidyashankar et al., 2012). En este estudio, la eficacia del 18.2% para el febendazol es mucho menor que la eficacia esperada del fármaco (en el caso de este estudio, se consideró una eficacia esperada del 95%) por lo que se puede sugerir con cierto nivel de certeza, que existe resistencia al febendazol en los caballos de Machachi, Ecuador. Para la ivermectina, si bien se encontró una eficacia del 100%, se debe tomar en cuenta las fuentes de variabilidad y por ende para el análisis de los resultados de este fármaco fue imprescindible el establecimiento de límites de confianza. El uso de estos se requiere para “evitar errores estadísticos tipo I” o en otras palabras evitar concluir que existe indicios de resistencia antihelmíntica cuando ésta no está presente (Vidyashankar et al.

2012). Cabe recalcar que para este estudio, el límite de confianza mínimo y máximo obtenido con una técnica estadística de bootstrap no-paramétrico basado en la mediana, tuvieron ambos un valor de 100%. Por lo tanto, el uso tanto de medianas frente a una distribución no paramétrica y el uso de métodos frecuentistas que minimizan variabilidad inherente, permitió establecer que en los predios analizados en Machachi, Ecuador no existe resistencia aparente en ciatostomas equinos a la ivermectina.

Cabe recalcar que este estudio también contó con un grupo control, el cual se utilizó para inferir que los cambios en patrones de oviposición en los grupos febendazol e ivermectina, se debió al tratamiento y no a factores de variabilidad externos no tomados en cuenta en el estudio. Para el grupo control, la mediana del porcentaje de reducción fue un número negativo (-16.7%). Esto se traduce en que existió un incremento en los conteos fecales. Sin embargo no existieron diferencias significativas entre conteos fecales pre-tratamiento y post-tratamiento, demostrando que el grupo control mantuvo sus conteos fecales constantes a través del tiempo. Tanto el grupo control como el grupo febendazol se comportaron de forma similar, sin embargo el porcentaje de reducción para el febendazol fue positivo, indicando una tendencia de disminución en conteos en el día 14 con respecto a día 0. Si bien el grupo control fue importante para descartar ciertos factores de variabilidad, se debe tomar en cuenta que los factores de variabilidad dentro del grupo se mantuvieron y fueron minimizados con el uso de estadística frecuentista.

Período de reaparición de oviposición

Según Kaplan & Nielsen (2010), posterior al uso de un antihelmíntico efectivo y la eliminación efectiva de parásitos adultos del lumen intestinal, el tiempo de reaparición de oviposición es equivalente al tiempo que tarda para que los estadios enquistados en la pared intestinal migren hacia el lumen intestinal, maduren, se reproduzcan y liberen sus huevos hacia las heces. Estudios críticos han sugerido que una disminución del período de reaparición, se puede deber a la ineficacia de un antihelmíntico en la eliminación de L4 maduros en el lumen

intestinal. Por lo tanto, tras la administración del antiparasitario, las L4 resistentes maduran y se reproducen. Este tiempo es menor al tiempo que normalmente tomaría, para que el proceso de migración, maduración y reproducción se complete en el lumen (Lyons et al., 2009 citado en Kaplan & Vidyashankar, 2012 y Molento et al., 2012).

Kaplan & Nielsen (2010), indican que si no existe una reducción en oviposición, no es posible evaluar períodos de reaparición, ya que la oviposición nunca fue eliminada. Por tal razón, ya que el grupo febendazol no expuso diferencias significativas entre conteos fecales pre-tratamiento y post-tratamiento, éste fue solamente analizado en términos de porcentajes de reducción de oviposición. En contraste, para el grupo ivermectina existió una reducción completa en los conteos fecales posterior al tratamiento, por ende se estableció el período de reaparición de oviposición exitosamente. El tiempo transcurrido entre el tratamiento con ivermectina y el momento en el que se evidenció reaparición de huevos en las heces, fue entre el día 42 y el día 56. Cabe recalcar que en estos días los conteos fecales fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$). En el día 42, se evidenció un recuento de huevos que representó un 6% de los huevos del conteo fecal pre-tratamiento. En el día 56, el recuento de huevos fue mayor y representó un 27% del recuento fecal pre-tratamiento. Por lo tanto, se sugiere que en algún momento entre la 6^{ta} y la 8^{va} semana post-tratamiento el recuento de huevos en las heces fue igual al 20% de recuento de huevos del conteo fecal pre-tratamiento.

Según Reinemeyer (2009), el momento de reaparición de oviposición se da cuando en las heces se encuentra 50% (no el 20%) del recuento de huevos encontrados en el conteo fecal pre-tratamiento. Si se toma en consideración el parámetro sugerido por Reinemeyer (2009), el período de reaparición fue mayor a las 8 semanas, ya que a los 80 días el 73% del recuento de huevos en el conteo fecal pre-tratamiento estaban presentes en las heces. Esto también se evidencia en que el día 0 y el día 80 no fueron significativamente diferentes. Por ende, al día 80 ya no existieron indicios de eficacia de la ivermectina.

Sin embargo, basado en los parámetros utilizados en la metodología del estudio, se determinó que el período de reaparición de oviposición para la ivermectina en caballos de Machachi, estuvo entre 6 y 8 semanas post-tratamiento. El subcomité de control parasitario de la AAEP (2003), sugiere que el período de reaparición de la ivermectina cuando fue introducido en el mercado estaba estimado entre las 9 y 13 semanas; actualmente, el período de reaparición de oviposición en poblaciones de parásitos susceptibles al fármaco es entre 6 y 8 semanas. Una disminución del período de reaparición es un indicio del proceso de selección de parásitos resistentes (Sangster, 1999). Por lo cuál, el presente estudio sugiere que en los ciatostomas de los equinos en las poblaciones de caballos analizadas en Machachi, no hay resistencia ni indicios de ésta a la ivermectina, ya que no existió disminución en el período de reaparición de oviposición. Esto claramente contrasta con aquellos estudios que han evidenciado un acortamiento del período de reaparición de huevos tras la administración de ivermectina como en Estados Unidos (Lyons et al., 2008) y Alemania (von Samson-Himmelstjerna et al., 2007), dónde los períodos de reaparición de huevos fueron de 4 semanas respectivamente. Así mismo, en otros dos estudios se reporta disminución en el tiempo de períodos de reaparición de oviposición en Suecia (Osterman Lind et al., 2007) y Dinamarca (Larsen et al., 2011).

Así como para la prueba de reducción de oviposición, se deben tomar en cuenta algunas consideraciones con respecto a factores de variabilidad al realizar determinaciones de período de reaparición de oviposición (Brady et al., 2009). Si bien una disminución del período de reaparición puede ser un indicio de resistencia, se debe tomar en cuenta que al calcular estos períodos de reaparición, existen los mismos factores de variabilidad relacionados a los conteos fecales pre y post-tratamiento mencionados previamente en el análisis para la pruebas de reducción de oviposición (Larsen et al., 2011). También, una vez obtenido el período de reaparición, se debe asumir que existieron variables que afectaron los resultados de los otros estudios con los cuáles se compara e infiere (Brady et al., 2009). Se debe tomar en consideración que en este estudio, el período de reaparición de oviposición para la ivermectina fue calculado con la mediana de los conteos fecales obtenidos. Recordando lo propuesto por

Vidyashankar et al., (2012) y Denwood et al., (2010) en relación al conteo fecal siendo tan solo un valor subestimado de la distribución de conteos fecales de un individuo, se puede concluir que el período de oviposición calculado para el estudio también está sujeto a factores de variabilidad (Vidyashankar et al., 2012; Denwood et al., 2010).

Consideraciones para formar un protocolo de control parasitario adecuado

Uno de los factores de variabilidad que afecta el conteo fecal individual de un animal y que debe tomarse en cuenta para elaborar un protocolo de control conservador de eficacia antihelmíntica, es la edad. Se ha observado que tanto las cargas parasitarias y los patrones de diseminación de huevos es distinto en caballos jóvenes en comparación a los caballos adultos (Boersema et al., 1996; Klei & Chapman, 1999). Por lo general, los conteos fecales en caballos adultos son más bajos que en aquellos caballos jóvenes (Becker et al., 2010 citado en Zarate, 2012). Así mismo, en caballos jóvenes el período de reaparición de huevos es distinto que en adultos (Coles et al., 2006). En particular, los caballos jóvenes tienen períodos de reaparición más cortos (Klei & Chapman, 1999). Según Vidyashankar et al., (2012) esto ocurre porque la eficacia de un fármaco se ve reducida en caballos jóvenes (por lo general caballos de 1 año de edad) por características biológicas que reducen la biodisponibilidad del fármaco. Algunas de estas características son motilidad intestinal, grasa corporal, dieta, y estado fisiológico de animal. Sin embargo, Klei & Chapman (1999) sugieren que tanto los conteos fecales altos como el acortamiento de períodos de reaparición de oviposición en caballos jóvenes, se debe a que en éstos caballos la cantidad de estadíos tempranos enquistados en la pared intestinal es superior que en caballos adultos. Además al no tener niveles de inmunidad óptimos, el nivel de infección parasitaria en los caballos jóvenes es más alto.

La inmunidad contra ciatostomas en equinos es adquirida y se desarrolla lentamente. Si bien la inmunidad se desarrolla en todos los animales, ésta depende de factores genéticos (Klei & Chapman, 1999). Sin embargo, a diferencia de la inmunidad que se genera contra *P. equorum* en caballos maduros, la

inmunidad que se adquiere contra ciatostomas no es adecuada ni completa. Por lo tanto, los caballos en pastoreo adquieren infección continuamente por lo que son diseminadores activos de huevos (Proudmann & Matthews, 2000). Tomando en cuenta que los niveles de infección son más altos en animales jóvenes, no es sorprendente que la ciatostominosis aguda se presente en caballos jóvenes entre 1 y 3 años de edad (Peregrine et al., 2014). Según Nielsen, (2014), los caballos por debajo de 4 años además de diseminar altas cantidades de huevos, no tienen patrones de diseminación constantes. Ya que los animales jóvenes son más propensos a infectarse con *P. Equorum* y son diseminadores erráticos de huevos, no se recomienda utilizar un control selectivo en estos animales (Nielsen et al., 2014a). Tomando en cuenta que 35% de los animales estuvieron entre 2 y 4 años de edad y 65% de los animales fueron animales adultos, se infiere que el factor de edad pudo haber tenido un impacto en los resultados obtenidos, tanto para las pruebas de reducción como para la determinación de períodos de reaparición de oviposición.

Según Nielsen (2014), aquellos caballos mayores a 4 años tienen un determinado “potencial contaminante” en relación al número de huevos que diseminan al medio ambiente. Esto quiere decir que en caballos adultos saludables mantenidos en pastoreo, los patrones de oviposición son muy constantes; sus conteos se mantienen en los mismos niveles con muy poca variación por largos períodos de tiempo. En otras palabras, el patrón de oviposición es predecible a para cada caballo (Nielsen et al., 2006 citado en AAEP, 2013). Sin embargo, hay tres tipos de diseminadores: diseminadores bajos (conteos fecales <200 hpg), moderados (conteos fecales entre 200 y 500 hpg) y altos (conteos fecales >500 hpg). (AAEP, 2013; Nielsen, 2014).

Ya que el presente estudio tuvo como objetivo determinar resistencia y se necesitaban conteos fecales pre-tratamiento suficientemente altos para determinar diferencias con los conteos post-fecales, los caballos que se seleccionaron fueron diseminadores moderados y altos. Al analizar la dispersión de los datos para los conteos fecales pre-tratamiento (Gráfico 2), es interesante observar que la mayoría de los datos se concentran en la parte inferior del

gráfico, cerca de los 200 HPG. Esto es consistente con un fenómeno común en todas las especies conocido como “sobre-dispersión” (AAEP, 2013), en donde la proporción de diseminadores bajos es mayor a comparación de aquellos animales con cargas parasitarias más altas (Soulsby, 2007). Por lo tanto, se considera que solamente un 20-30% de los caballos en una población son responsables del 80% de los huevos que se diseminan al medio ambiente (Nielsen et al., 2014a). El protocolo selectivo se basa en tratar únicamente a la proporción menor de caballos cuyas cargas parasitarias son moderadas y altas en tiempos específicos del año. De esta manera se limita el uso innecesario de antihelmínticos y se retrasa la generación de resistencia (Reinemeyer, 2009; Stratford et al., 2013; Nielsen, 2014).

Los objetivos primordiales de un protocolo de control parasitario es mantener la salud óptima y desempeño del hospedador, minimizar la diseminación de parásitos y prevenir el desarrollo de resistencia antihelmíntica (Reinemeyer, 2009; Kaplan & Nielsen, 2010; AAEP, 2013). Tanto la información sobre eficacia de los fármacos utilizados en un predio, como de los patrones de diseminación de cada caballo son fundamentales para cumplir estos objetivos (Soulsby, 2007; Reinemeyer, 2009). Así mismo, se debe tomar en cuenta que el desarrollo de resistencia depende de factores relacionados a tres componentes: el hospedero (equino), el huésped (ciatostomas) y el medio ambiente (Nielsen et al., 2014b). Si bien algunos factores determinantes del desarrollo de resistencia son inevitables, otros pueden ser ajustados para que la velocidad del desarrollo de resistencia disminuya (von Samson-Himmelstjerna et al., 2012). En el siguiente esquema (Ilustración 2) se pueden apreciar los factores relacionados a cada uno de los componentes que afectan el desarrollo de resistencia.

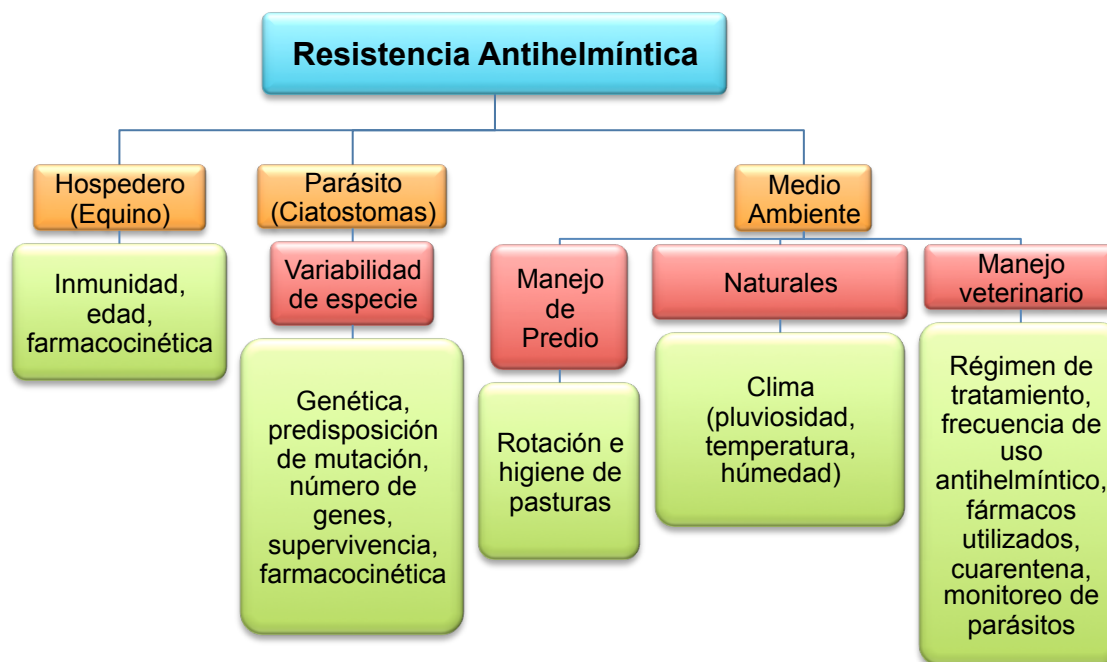


Ilustración 2. Componentes y factores que tienen una influencia en el desarrollo de resistencia (Kaplan, 2004; von Samson-Himmelstjerna et al., 2012; Nielsen et al., 2014b)

La manera más óptima de preservar eficacia antihelmíntica al usar un protocolo de control determinado es procurando que la población de parásitos en refugia se mantenga para así promover la dilución de genes resistentes de aquellos parásitos seleccionados por tratamiento antihelmíntico (Sangster, 1999; Nielsen et al., 2007). Según Van Wyk (2001) y Kaplan (2004), se sugiere que mientras mayor sea la proporción de parásitos en refugia, la velocidad del desarrollo de resistencia se reduce. Se pueden tomar ciertas medidas para mantener parásitos en las tres fuentes de refugia. Al no desparasitar a caballos con conteos fecales indicativos de diseminación baja, se mantiene un reservorio de parásitos no expuestos al fármaco (fuente 1. caballos no tratados). Estos caballos no tratados diseminan huevos de parásitos susceptibles, contribuyendo así también a aquella porción de refugia que se encuentra en pasturas (fuente 2. medio ambiente; Soulsby, 2007) El uso de fármacos que no tienen efectividad ante aquellos estadios larvarios enquistados en la pared intestinal del hospedero también mantienen un reservorio de genes susceptibles al no exponer el fármaco

a los numerosos parásitos que se encuentran en esta fase del ciclo (fuente 3. pared intestinal; Kaplan, 2004; Nielsen et al., 2007).

Los fármacos con efectividad sobre los estadíos larvarios enquistados que en consecuencia, reducirían la población de refugia, es la moxidectina a una dosis de 0.4 mg/kg y el febendazol a una dosis larvicida alta de 10 mg/kg por 5 días consecutivos (Reinemeyer, 2009; Rossano et al., 2010). El uso de estos fármacos debería ser limitado, debido que podrían incrementar la velocidad de resistencia y son considerados terapéuticos en casos de enfermedad (Nielsen et al., 2007). En caso de que se evidencie resistencia al fármaco, éste no se debería usar como tratamiento (Rossano et al., 2010). Por otra parte, la ivermectina (0.2 mg/kg), las sales de pirantel (dosis depende si es pamoato o tartrato) y el febendazol (7.5 mg/kg) no tienen efecto sobre los estadíos larvarios de la pared intestinal, por lo que ayudan a preservar aquella fuente de refugia (Kaplan, 2002). Sin embargo, estos fármacos no proveen un beneficio directo al hospedador, debido que los estadíos larvarios enquistados en la pared intestinal son aquellos que producen enfermedad (Love et al., 1999; Nielsen et al., 2007; AAEP, 2013). No es sorprendente observar que en la anamnesis de un caballo que presente o haya presentado un cuadro de ciatostominosis aguda, haya tenido un tratamiento reciente con un desparasitante efectivo contra larvas adultas, sugiriendo que la eliminación de las larvas adultas induce a que los estadíos enquistados migren para repoblar el lumen intestinal nuevamente (Nielsen et al., 2007), produciendo enfermedad clínica si la carga parasitaria en la pared intestinal es muy alta. También se ha propuesto que la inducción de hipobiosis en larvas en la fase de enquistamiento ocurre por señales que envían las larvas adultas desde el lumen intestinal (Love et al., 1999; Stancampiano & Usai, 2015). Esto coincide con la migración larvaria tras la eliminación de los estadíos lumbinales.

Además de preservar refugia, un protocolo de control parasitario tiene que estar dirigido a disminuir la contaminación de huevos en pasturas, lo cual permita reducir los niveles de infección a nivel de hospedador (Soulsby, 2007; Reinemeyer, 2009). El uso de antihelmínticos, además de estar dirigido solo a ciertos animales selectos, debe restringirse a aquellos momentos en los que el

medio ambiente provee condiciones adecuadas de temperatura y humedad tanto para el desarrollo como supervivencia de huevos y larvas en pasturas. Estudios de laboratorio han demostrado que la temperatura óptima para supervivencia de huevos y larvas está entre 25°C y 33°C con un límite bajo de 7.5°C a 10°C (Ogbourne, 1972 citado en Nielsen et al., 2007; Rupashinge & Ogbourne, 1978 citado en Nielsen et al., 2007; Mfitlodze & Hutchinson, 1987) y un límite alto de 38°C (Rupashinge & Ogbourne, 1978 en Nielsen et al., 2007). Niveles de humedad por debajo de 15-20% inhiben el desarrollo de larvas (Mfitlodze & Hutchinson, 1987). De acuerdo a esto, el tratamiento antihelmíntico debe ser instaurado en aquellas épocas óptimas de transmisión, dónde las poblaciones de refugia en el medio ambiente son adecuadas (Reinemeyer, 2009; Nielsen et al., 2007; AAEP, 2013). Cuando las condiciones son detrimentales para la supervivencia de estadíos pre-infectivos y de L3 en el medio ambiente, el uso de antihelmínticos es irrelevante ya que el potencial infectivo en pasturas es bajo y la población en refugia es pequeña (Baudena, 2000; Nielsen et al., 2007; AAEP, 2013). De acuerdo a esto se recomienda que en lugares templados/fríos no se implemente el uso de antihelmínticos en los meses más fríos (invierno). De forma contraria, en lugares tropicales o subtropicales se recomienda que no se haga uso de antihelmínticos en los meses más calientes (verano) (Courtney, 1999; Nielsen et al., 2007; AAEP, 2013). Tomando en cuenta que el estudio se desarrolló en el sector de Machachi, esfuerzos para añadir información con respecto a patrones climáticos fueron realizados. Sin embargo, el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrológica (INAMHI) no pudo proveer información actualizada sobre el clima en el sector de Machachi y sus zonas colindantes. Se infiere que los meses más calientes son los meses de verano (junio, julio, agosto, septiembre). Sin embargo, se duda que las temperaturas excedan los 38°C. Se requieren estudios al respecto, pero se podría inferir que los patrones climáticos de Machachi, Ecuador a través del año son propicios tanto para el desarrollo como la supervivencia de larvas en el medio ambiente. Según Mfitlodze & Hutchinson (1988), en los trópicos, las temperaturas son óptimas todo el año para el desarrollo larvario en pasturas.

Por último, el control y manejo de pasturas es un factor importante cuando se considera que se debe reducir la contaminación de huevos y larvas del medio ambiente. Debido a que los huevos de ciatostomas pasan en las heces, éstas están altamente contaminadas y son las fuentes de contaminación para las pasturas (Lyons et al., 1999). Según Reinemeyer (2009) y Nielsen et al., (2007), la translación a larvas y el movimiento de éstas desde la materia fecal a la pastura está determinada por condiciones medio ambientales; entre éstas están los niveles óptimos de oxígeno, humedad, y temperatura. Por lo tanto, la remoción física y temprana de materia fecal de las pasturas disminuye su potencial infectivo al medio ambiente; la dispersión de heces no es una práctica que se debe aplicar, debido a que esto solo contribuye a la dispersión de los parásitos en la pastura (AAEP, 2013). El compostaje adecuado por un mínimo de dos semanas a temperaturas altas (>40° C) elimina tanto huevos (Nielsen et al., 2007) como larvas pre-infectivas e infectivas (AAEP, 2013), por lo cuál es un manejo que se debería instaurar en cualquier predio dónde hayan equinos.

En la mayoría de las propiedades analizadas, además de usar protocolos de control a intervalo (rotativos y no rotativos), en ninguna propiedad se hace uso de protocolos de control parasitario selectivo y tampoco se toma en cuenta la higiene de pasturas (Tabla 8). Los esquemas de rotación de pasturas dependen del tamaño de potrero y de la cantidad de pasto disponible. Según Lyons et al., (1999), el nivel de infectividad de una pastura se reduce al mantener los caballos lejos de ésta por meses. Por ende este factor depende del espacio y de la capacidad de manejo de cada propiedad. Cabe recalcar que una de las propiedades del estudio basa la rotación de los caballos en pasturas según el movimiento de ganado. Una vez que el ganado ha terminado de bajar el nivel del pasto, se introducen a los caballos. Ya que el pastoreo simultáneo con otras especies se recomienda como método para reducir la contaminación de pasturas, se puede suponer que en esta propiedad el potencial infectivo a nivel de pasturas es más bajo que en otras propiedades (tabla 8.) Sin embargo, hay que tomar en cuenta, que la infección con *Trichostrongylus axei* es más común en caballos que conviven con rumiantes, especialmente con ganado bovino (Lyons et al., 1999).

Limitaciones y fortalezas del estudio

Entre las limitaciones del estudio están todos los factores de variabilidad inherentes al conteo fecal en caballos. Si bien se pudo utilizar medidas estadísticas que reducen el impacto de estos factores, la detección temprana de resistencia a la ivermectina pudo haber estado comprometida. La inclusión de animales por debajo de los 4 años de edad también se reconoce que fue factor de variabilidad que pudo haber afectado los resultados del estudio; sin embargo, al haber contado con un número inicial de 117 caballos de los cuáles solo se pudo contar con aquellos animales con conteos fecales por encima de 200 hpg, perder un 35% (proporción de animales jóvenes en el estudio) de animales también hubiera afectado los resultados. Adicionalmente, el número de animales que se utilizó para el estudio también fue una limitación. En cuanto a la técnica utilizada para los conteos fecales, la sensibilidad mínima que se pudo utilizar fue de 25 hpg; una sobreestimación de eficacia y una falla de detección de desarrollo de resistencia temprano para la ivermectina pudo ser real.

También existieron limitaciones que en general se enfrentan todos los estudios que analizan resistencia antihelmíntica en equinos. La más importante siendo la falta de consenso que existe en la comunidad de parasitología equina con respecto a los límites que definen resistencia. Tanto para la prueba de reducción como para la determinación de reaparición de oviposición, existen discrepancias en cuanto a definiciones y umbrales (Coles et al., 2006; Vidyashankar et al., 2012; Kaplan & Nielsen, 2010), lo que hace que la comparación entre estudios sea difícil y un tanto subjetiva. De hecho la AAEP (2013), recomienda que un resultado de eficacia debe ser tomado con prudencia ya que los varios límites pre-establecidos son tan solo una guía mas no una regla. Así mismo, al momento de hacer recomendaciones para control parasitario selectivo, se encuentran diferentes límites y definiciones de los tres tipos de diseminadores.

Entre las fortalezas del estudio estuvo el uso de una técnica consistente tanto en la administración de fármacos como en la toma de muestras y en la realización de conteos fecales. En cuanto al análisis estadístico en el estudio, a diferencia del uso común del promedio para analizar resultados en grupos pequeños de caballos (Kaplan & Nielsen, 2010; Molento et al., 2012), se tomó en cuenta la distribución no paramétrica de los datos y su análisis se basó en pruebas no paramétricas. Al reconocer esto, la variabilidad se pudo reducir al utilizar la mediana de los resultados.

Los resultados de eficacia reducida para el febendazol fueron bastante contundentes, aún tomando en cuenta factores de variabilidad. Para la ivermectina, si bien se consideran factores que pudieron afectar la determinación de resistencia temprana, tanto los resultados de la prueba de reducción como la determinación de períodos de reaparición demostraron la eficacia esperada del fármaco. Si bien hubieron limitaciones, se pudieron cumplir tanto los objetivos específicos como el objetivo principal del estudio.

CONCLUSIONES

- En la población de caballos analizada, se encontró que la eficacia del febendazol fue de 18.2%, lo que indica que se encontraron poblaciones de ciatostomas equinos resistentes al fármaco en Machachi, Ecuador.
- En la población de caballos analizada, se encontró que la eficacia de la ivermectina fue del 100%, lo que indica que en los predios analizados en el sector de Machachi, Ecuador las poblaciones de ciatostomas son sensibles al fármaco.
- Cuando se hacen pruebas de reducción de oviposición y determinación de períodos de reaparición de oviposición se debe tomar en cuenta la variabilidad de los datos y hacer uso tanto de técnicas como de herramientas estadísticas apropiadas para no subestimar la eficacia de un fármaco.
- Hay que tomar estrategias nuevas en el control de parásitos en equinos ya que las prácticas que actualmente se utilizan, incrementan el desarrollo de resistencia y por lo tanto no son sostenibles.

RECOMENDACIONES

En el Ecuador existe un amplio campo de investigación en el área de parasitología equina; la información rescatada en esta área en la actualidad es reducida. Tomando en cuenta la información que se presenta en este documento, se recomiendan algunos temas que deberían ser considerados en el futuro para así poder llevar a cabo estrategias de control efectivas y sostenibles. Se debe tomar en cuenta para cualquiera de estos estudios que para que los resultados tengan validez externa, se requiere un número alto de sujetos de estudio. El uso de estadística adecuada también es imprescindible para la interpretación adecuada de los datos obtenidos. Así mismo, tomando en cuenta que el presente estudio solo consideró dos fármacos, se recomienda utilizar los fármacos que existen en el mercado a las dosis recomendadas por las casas comerciales. A raíz de la información que se provee en este documento se proponen los siguientes estudios:

- Tomando en cuenta que la resistencia antihelmíntica es un resultado del uso indiscriminado de antihelmínticos, sería interesante poder tener una referencia basada en encuestas del manejo que se está haciendo en las propiedades que albergan equinos. Así se podría hacer inferencias sobre el status de resistencia no solo a nivel de un predio pero a nivel de sector, región, o país.
- Recordando que el ciclo de vida de los ciatostomas equinos depende mucho del clima, se recomienda hacer estudios en distintas regiones del país para evaluar el comportamiento del parásito y así poder definir los tiempos dónde la transmisión del parásito es mayor. Así, una vez establecido el período del año dónde la población de parásitos en refugia es mayor, establecer el momento adecuado para la administración de antihelmínticos.
- Ya que este estudio toma en cuenta solamente a ciatostomas equinos, se recomienda hacer estudios tanto sobre prevalencia como patrones de resistencia

en otros parásitos causantes de enfermedad en el equino, especialmente *Strongylus* spp. y *Parascaris equorum*.

- Tomando en cuenta el uso de la moxidectina (0.4mg/kg) y del febendazol (a dosis alta por días consecutivos) para la eliminación de estadios larvarios enquistados en mucosa intestinal, se recomienda hacer estudios de resistencia exhaustivos para determinar la eficacia de los fármacos y poder hacer recomendaciones para su uso limitado.

Para todos los estudios recomendados y para cualquier aplicación de pruebas de resistencia, es importante tomar en cuenta que el manejo y la población de caballos en cada predio varía y por ende la información obtenida no siempre tiene validez externa ya que hay muchos factores de variabilidad. En otras palabras, no porque exista resistencia antihelmíntica en una propiedad va a haber resistencia en otra. Por ende, se recomienda que al diseñar un protocolo de control parasitario estratégico se tome en cuenta a cada predio individualmente.

- Tanto propietarios de caballos como veterinarios en medicina equina deben siempre recordar que el control parasitario en equinos no está diseñado para una población de caballos sino que este debe tomar en cuenta el estado de cada caballo y se debe tomar decisiones a nivel de individuo para así beneficiar a la población entera.

REFERENCIAS

- American Association of Equine Practitioners. (2013). AAEP Parasite Control Guidelines. *AAEP*, 1-24.
- Baudena, M.A. (2003). Equine Immunity to Cyathostome Infections. *Retrieved from Louisiana State University ETD Collection*. etd-0609103-140047
- Baudena, M.A., Chapman, M. R., French, D. D., & Klei, T. R. (2000). Seasonal development and survival of equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana . *Veterinary Parasitology*, 88, 51-60.
- Bemrick, W. J. (1978). Tolerance of Equine Strongylid Larvae to Desiccation and Freezing. *Cryobiology*, 15, 214-218.
- Boersema, J., Eysker, M., Maas, J., & Van der Aar, W. (1996). Comparison of the reappearance of strongyle eggs in foals, yearlings, and adult horses after treatment with ivermectin or pyrantel. *Veterinary Quarterly*, 18 (1), 7-9.
- Brady, H. A., ACAP, D., & Nichols, W. T. (2009). Drug Resistance in Equine Parasites: An Emerging Global Problem. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29 (5), 285-295.
- Brazik, E. L., Luquire, J. T., & Little, D. (2006). Pyrantel pamoate resistance in horses receiving daily administration of pyrantel tartrate. *JAVMA*, 228 (1), 101-103.
- Canever, R. J., Braga, P. R., Boeck, A., Grycajuck, M., Bier, D., & Molento, M. B. (2013). Lack of Cyathostomin sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 194, 35-39.
- Cardona Z, E. A. (2005). La coprología como técnica de diagnóstico. *Parasitología Práctica Veterinaria*, 1-13.
- Castaño Zubieta, R. (2005). Parásitos de los equinos. *Red de Helminología para América Latina y el Caribe*. Obtenido en: <http://helmino.inta.gob.ar/Confe05/Raquel%20Castaño.html>
- Clark, H. J., Kaplan, R. M., Matthews, J. B., & Hodgkinson, J. E. (2005). Isolation and characterisation of a beta tubulin isotype 2 gene from two species of cyathostomin. *International Journal for Parasitology*, 35, 349-358.
- Cobb, R., & Boeckh, A. (2009). Moxidectin: a review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses. *Parasites & Vectors*, 2, Suppl 2, 1-8.
- Coles, G., Bauer, C., Borgsteede, F., Geerts, S., Klei, T., Taylor, M., et al. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

- (W.A.A.V.P) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44, 35-44.
- Coles, G. C., Jackson, F., Pomroy, W. E., Prichard, R. K., von Samson Himmelstjerna, G., Silvestre, A., et al. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136, 167-185.
- Corning, S. (2009). Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasites & Vectors*, 2, Suppl 2, 1-6.
- Courtney, C. H. (1999). Seasonal transmission of equine cyathostomes in warm climates. *Veterinary Parasitology*, 85, 173-180.
- Cringoli, G. (2006). Flotac, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. *Parassitologia*, 48(3), 381-384.
- Denwood, M., Reid, S., Love, S., Nielsen, M., Matthews, L., McKendrick, I., et al. (2010). Comparison of three alternative methods for analysis of equine Faecal Egg Count Reduction Test data. *Preventive Veterinary Medicine*, 93, 316-323.
- dos Santos, C. N., de Souza, L. S., Quinelato, S. B., do Couto, M. C., Pinheiro, J., & de A. Rodrigues, M. L. (2011). Seasonal dynamics of cyathostomin (Nematoda-Cyathostominae) infective larvae in *Brachiaria humidicola* grass in tropical southeast Brazil. *Veterinary Parasitology*, 180, 274-278.
- Francisco, R., Paz-Silva, A., Francisco, I., Cortiñas, F. J., Miguélez, S., Suárez, J., et al. (2012). Preliminary Analysis of the Results of Selective Therapy Against Strongyles in Pasturing Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32, 274-280.
- Garcia, A., Brady, H. A., Nichols, W. T., & Prien, S. (2013). Equine Cyathostomin Resistance to Fenbendazole in Texas Horse Facilities. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33, 223-228.
- Kaplan, R. M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Parasite Genomics Protocols*, 20 (10), 477-481.
- Kaplan, R. M., & Vidyashankar, A. N. (2012). An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 186, 70-78.
- Kaplan, R. M., Klei, T. R., Lyons, E. T., Lester, G., Courtney, C. H., French, D. D., et al. (2004). Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms. *JAVMA*, 225 (6), 903-910.
- Kaplan, R., & Nielsen, M. (2010). An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore. *Equine Veterinary Education*, 22 (6), 306-316.

- Klei, T. R., & Chapman, M. R. (1999). Immunity in equine cyathostome infections. *Veterinary Parasitology*, *85*, 123-136.
- Klei, T. P., Rehbein, S., Visser, M., Langholff, W. K., Chapman, M. R., French, D. D., et al. (2001). Re-evaluation of ivermectin efficacy against equine gastrointestinal parasites. *Veterinary Parasitology*, *98*, 315-320.
- Kuzmina, T., & Kharchenko, V. (2008). Anthelmintic resistance in cyathostomins of brood horses in Ukraine and influence of anthelmintic treatments on strongylid community structure. *Veterinary Parasitology*, *154*, 277-288.
- Kyvsgaard, N. C., Lindborn, J., Lundberg Andreassen, L., Luna-Olivares, L. A., Nielsen, M. K., & Monrad, J. (2011). Prevalence of strongyles and efficacy of fenbendazole and ivermectin in working horses in El Sauce, Nicaragua. *Veterinary Parasitology*, *181*, 248-254.
- Lacey, E. (1990). Mode of Action of Benzimidazoles. *Parasitology Today*, *6* (4), 112-115.
- Larsen, M. L., Ritz, C., Petersen, S. L., & Nielsen, M. K. (2011). Determination of ivermectin efficacy against cyathostomins and *Parascaris equorum* on horse farms using selective therapy. *The Veterinary Journal*, *188*, 44-47.
- Lichtenfels, J. R., Gibbons, L. M., & Krecek, R. C. (2002). Recommended terminology and advances in the systematics of the Cyathostominae (Nematoda: Strongyloidea) of horses. *Veterinary Parasitology*, *107*, 337-342.
- Love, S., Murphy, D., & Mellor, D. (1999). Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology*, *85*, 113-122.
- Luksovsky, J., Craig, T. M., Bingham, G. M., Cyr, T., & Forrest, D. (2013). Determining Treatment to Control Two Multidrug-Resistant Parasites on a Texas Horse Farm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 115-119.
- Luz Pereira, A.B., Cavichioli, J.H., Guimarães Jr., J.S., Batiston, A., Gusmão, R.A.M. (1994). Eficácia a campo do mebendazole, oxicandazole, pamoato de pirantel e doramectin contra pequenos estrongilídeos (cyathostominae) de eqüinos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, *3* (2), 93-97.
- Lyons, E. T., Tolliver, S. C., & Drudge, J. H. (1999). Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. *Veterinary Parasitology*, *85*, 97-112.
- Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Ionita, M., Lewellen, A., Collins, S.S. (2008). Field studies indicating reduced activity of ivermectin on small Strongyles in horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitol. Res*, *103*, 209-215.

- Márquez Lara, D. (2003). Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. *Revista Corpoica*, 4 (1), 55-71.
- Matthews, J. B (2014). Anthelmintic resistance in equine nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4, 310-315.
- Matthews , J. B., McArthur , C., Robinson , A., & Jackson , F. (2012). The in vitro diagnosis of anthelmintic resistance in cyathostomins. *Veterinary Parasitology*, 185, 25-31.
- Mfifilodze, M. W., & Hutchinson, G. W. (1987). Development and survival of free-living stages of equine strongyles under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology*, 23, 121-133.
- Mfifilodze , M. W., & Hutchinson, G. W. (1988). Development of Free-living Stages of Equine Strongyles in Faeces on Pasture in a Tropical Environment . *Veterinary Parasitology*, 26, 285-296.
- Milillo, P., Boeckh, A., Cobb, R., Otranto, D., Lia, R. P., Perrucci , S., et al. (2009). Faecal Cyathostomin Egg Count distribution and efficacy of anthelmintics against cyathostomins in Italy: a matter of geography? *Parasites & Vectors*, 2, Suppl 2, S4.
- Molento, M., Antunes, J., Bentes, R., & Coles, G. (2008). Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Veterinary Record*, 162, 384-385.
- Molento, M., Nielsen, M. K., & Kaplan, R. M. (2012). Resistance to avermectin/milbemycin anthelmintics in equine cyathostomins-Current situation. *Veterinary Parasitology*, 185, 16-24.
- Morales, A. A., Bello, H., & Villoria, D. (2012). Prevalencia de parásitos gastrointestinales en equinos Pura Sangre de Carrera durante el período de cuarentena 2012 en el hipódromo "La Rinconada" Caracas, Venezuela. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol*, 71 (2), 179-182.
- Nareaho, A., Vainio, K., & Oksanen, A. (2011). Impaired efficacy of ivermectin against *Parascaris equorum*, and both ivermectin and pyrantel against strongyle infections in trotter foals in Finland. *Veterinary Parasitology*, 182, 372-377.
- Nielsen, M.K. (2014). Internal Parasite Screening and Control. In Robinson N.E.& Sprayberry, K.A. (Eds.), *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine* (pp. 336-340). Missouri: Elsevier.
- Nielsen, M. K., Monrad, J., & Olsen, S. N. (2006). Prescription-only anthelmintics-- A questionnaire survey of strategies for surveillance and control of equine strongyles in Denmark. *Veterinary Parasitology*, 135, 47-55.

- Nielsen, M., Kaplan, R., Thamsborg, S., Monrad, J., & Olsen, S. (2007). Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles: Implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance. *The Veterinary Journal*, 174, 23-32.
- Nielsen, M. K., Vidyashankar, A. N., Olsen, S. N., Monrad, J., & Thamsborg, S. M. (2012). *Strongylus vulgaris* associated with usage of selective therapy on Danish horse farms- Is it reemerging? *Veterinary Parasitology*, 189, 260-266.
- Nielsen, M., Betancourt, A., Lyons, E., Horohov, D., & Jacobsen, S. (2013). Characterization of the inflammatory response to anthelmintic treatment of ponies with cyathostomiasis. *The Veterinary Journal*, 198, 457-462.
- Nielsen, M. K., Pfister, K., & von Samson-Himmelstjerna, G. (2014a). Selective therapy in equine parasite control- Application and limitations. *Veterinary Parasitology*, 202, 95-103.
- Nielsen, M., Reinemeyer, C., Donecker, J., Leathwick, D., Marchiondo, A., & Kaplan, R. (2014b). Anthelmintic resistance in equine parasites- Current evidence and knowledge gaps. *Veterinary Parasitology*, 204, 55-63.
- Ochoa Mejía, E. P. (2013). Identificación de *Strongylus* spp. en Equinos de las Parroquias Rurales del Cantón Cuenca. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador.
- Osterman Lind, E., Kuzmina, T., Ugglå, A., Waller, P.J., Höglund, J. (2007). A field study on the effect of some anthelmintic on cyathostomins of horses in Sweden. *Vet. Res. Commun*, 31, 53-65.
- Otto, M.A., Gallio, M., Belmonte, I., Fernandes, C., Gaspary, F., Gama, J., Dotto, J., Monteiro, F.S.G. (2008). Eficácia de antiparasitários no controle de helmintos em cavalos mantidos em campo nativo na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. In: Anais 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado RS, pp. 486-493.
- Peregrine, A., Beltrao Molento, M., Kaplan, R., & Nielsen, M. (2014). Anthelmintic resistance in important parasites of horses: Does it really matter? *Veterinary Parasitology*, 201, 1-8.
- Pereira, J. R., & Vianna, S. S. (2006). Gastrointestinal parasitic worms in equines in the Paraíba Valley, State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 140, 289-295.
- Pérez, R., Cabezas, I., García, M., Rubilar, L., Sutra, J.F., Galtier, P., Alvinerie, M. (1999). Comparison of the pharmacokinetics of moxidectin (Equest) and ivermectin (Eqvalan) in horses. *J. Vet. Pharmacol. Ther*, 22, 174-180.

- Pook, J. F., Power, M. L., Sangster, N. C., Hodgson, J. L., & Hodgson, D. R. (2002). Evaluation of tests for anthelmintic resistance in cyathostomes. *Veterinary Parasitology*, 106, 331-343.
- Prichard, R., Ménez, C., & Lespine, A. (2012). Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 134-153.
- Prokulewicz, A., Pilarczyk, B., & Tomza-Marciniak, A. (2014). Evaluation of the Efficacy of Doramectin in the Control of Strongyle (Strongylidae, Cyathostominae) Infestation in Horses. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 69, 83-87.
- Proudman, C., & Matthews, J. (2000). Control of intestinal parasites in horses. *Equine Practice*, 22, 90-97.
- Quinelato, S., Couto, M. C., Ribeiro, B. C., Santos, C. N., de Souza, L. S., dos Anjos, D. H., et al. (2008). The ecology of horse cyathostomin infective larvae (Nematoda-Cyathostominae) in tropical southeast Brazil. *Veterinary Parasitology*, 153, 100-107.
- Ramsey, Y. H., Christley, R. M., Matthews, J. B., Hodgkinson, J. E., McGoldrick, J., & Love, S. (2004). Seasonal development of Cyathostominae larvae on pasture in a northern temperate region of the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*, 119, 307-318.
- Reinemeyer, C. R. (1999). Current concerns about control programs in temperate climates. *Veterinary Parasitology*, 85, 163-172.
- Reinemeyer, C. R. (2009). Rational Approaches to Equine Parasite Control. *Kentucky Equine Research*, IV, 411-419.
- Reinemeyer, C. R., & Nielsen, M. K. (2009). Parasitism and Colic. *Vet Clin Equine*, 25, 233-245.
- Reinemeyer, C. (2012). Anthelmintic resistance in non-strongylid parasites of horses. *Veterinary Parasitology*, 185, 9-15.
- Rossano, M. G., Smith, A. R., & Lyons, E. T. (2010). Shortened strongyle-type egg reappearance periods in naturally infected horses treated with moxidectin and failure of a larvicidal dose of fenbendazole to reduce fecal egg counts. *Veterinary Parasitology*, 173, 349-352.
- Sangster, N. C. (1999). Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins? *Veterinary Parasitology*, 85, 189-204.
- Soulsby, L. (2007). New concepts in strongyle control and anthelmintic resistance: The role of refugia. *The Veterinary Journal*, 174, 6-7.

- Stancampiano, L., & Usai, F. (2015). The role of density-dependent arrested larval stages on parasite dynamics and stability: Lessons from nematodes and donkeys. *Ecological Modelling*, 297, 69-79.
- Stratford, C., Lester, H., Morgan, E., Pickles, K., Relf, V., McGorum, B., et al. (2014). A questionnaire study of equine gastrointestinal parasite control in Scotland. *Equine Veterinary Journal*, 46, 25-31.
- Tandon, R., & Kaplan, R. M. (2004). Evaluation of a larval development assay (DrenchRite) for the detection of anthelmintic resistance in cyathostomin nematodes of horses. *Veterinary Parasitology*, 121, 125-142.
- Tarigo-Martinie, J. L., Wyatt, A. R., & Kaplan, R. M. (2001). Prevalence and clinical implications of anthelmintic resistance in cyathostomes of horses. *JAVMA*, 218 (12), 1957-1960.
- Traversa, D., Klei, T.R., Iorio, R., Paoletti, B., Lia, R.P., Otranto, D., Sparagano, O.A.E., Giangaspero, A. (2007). Occurrence of anthelmintic resistant equine cyathostome population in central and southern Italy. *Prev. Vet. Med*, 82, 314–320.
- Traversa, D., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Milillo, P., Schurmann, S., Barnes, H., Otranto, D., Perrucci, S., di Regalbono, A.F., Beraldo, P., Boeckh, A., Cobb, R. (2009). Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. *Parasit. Vectors*, 2 (Suppl. 2), S2.
- Uhlinger, C. (1993). Uses of fecal egg count data in equine practice. *Comp. Cont. Educ. Pract*, 15, 742–749.
- Van Wyk, J. A. (2001). Refugia-- overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Oderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68, 55-67.
- Vidyashankar, A. N., Hanlon, B. M., & Kaplan, R. M. (2012). Statistical and biological considerations in evaluating drug efficacy in equine strongyle parasites using fecal egg count data . *Veterinary Parasitology*, 185, 45-56 .
- von Samson-Himmelstjerna, G., Fritzen, B., Demeler, J., Schurmann, S., Rohn, K., Schnieder, T., Epe, C. (2007). Cases of reduced cyathostomins egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Vet. Parasitol*, 144, 74–80.
- von Samson-Himmelstjerna, G. (2012). Anthelmintic resistance in equine parasites-detection, potential clinical relevance and implications for control. *Veterinary Parasitology*, 185, 2-8.

- von Witzendorff, C., Quintana, I., Sievers, G., Schnieder, T., & von Samson-Himmelstjerna, G. (2003). Estudio sobre resistencia frente a los benzimidazoles de pequeños estróngilos (Cyathostominae) del equino en el sur de Chile. *Arch. Med. Vet.*, XXXV (2), 187-194.
- Vysniauskas, A., Kaziunaitė, V., Kaminskaitė, I., Petkevicius, S., Pereckiene, A., & Craven, B. J. (2004). The role of extense efficacy in the evaluation of anthelmintic resistance in horse strongyles. *Helminthologia*, 41 (2), 73-79.
- Zajac, A.M., (2012). Integrated Control of Equine Cyathostomes. In Robinson N.E. & Sprayberry, K.A. (Eds.), *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine* (pp.443-447). Missouri: Elsevier
- Zarate, D. A. (2003). Optimization of a Larval Migration Inhibition Assay (LMIA) for Determining In vitro Susceptibility of Equine Cyathostomins to Macrocyclic Lactone Anthelmintics, and Evaluation of Variation in Species-Specific drug Tolerance Levels using a 454 Large-Scale Parallel Pyrosequencing System. University of Georgia. Obtenido de: https://getd.libs.uga.edu/pdfs/zarate-rendon_daniel_a_201208_ms.pdf

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación de las especies de ciatostomas (modificado de Lichtenfels et al., 2008) Se marcan con (*) las 12 especies más prevalentes en infecciones parasitarias (Lyons et al., 1999; Kaplan, 2002)

Género	Especies
Cyathostomum	<i>Cyathostomum tetracanthum</i> <i>Cyathostomum alveatum</i> <i>Cyathostomum catinatum*</i> <i>Cyathostomum montgomeryi</i> <i>Cyathostomum pateratum*</i>
Cylicostephanus	<i>Cylicostephanus calicatus*</i> <i>Cylicostephanus asymmetricus</i> <i>Cylicostephanus bidentatus</i> <i>Cylicostephanus goldi*</i> <i>Cylicostephanus hybridus</i> <i>Cylicostephanus longibursatus*</i> <i>Cylicostephanus minutus*</i>
Coronocyclus	<i>Coronocyclus coronatus*</i> <i>Coronocyclus labiatus*</i> <i>Coronocyclus labratus*</i> <i>Coronocyclus sagittatus</i> <i>Coronocyclus ulambajari</i>
Cylicocyclus	<i>Cylicocyclus brevicapsulatus</i> <i>Cylicocyclus nassatus*</i> <i>Cylicocyclus asini</i> <i>Cylicocyclus ashworthi</i> <i>Cylicocyclus triramosus</i> <i>Cylicocyclus auriculatus</i> <i>Cylicocyclus ultrajectinus</i> <i>Cylicocyclus insigne*</i> <i>Cylicocyclus gyalcephaloides</i> <i>Cylicocyclus elongatus</i> <i>Cylicocyclus adersi</i> <i>Cylicocyclus leptostomum*</i> <i>Cylicocyclus radiatus</i>
Skrjabinodentus	<i>Skrjabinodentus longiconus</i> <i>Skrjabinodentus tshojoi</i>

	<i>Skrjabinodentus caragandicus</i>
Parapoteriostomum	<i>Parapoteriostomum mettami</i> <i>Parapoteriostomum euproctus</i> <i>Parapoteriostomum schuermanni</i> <i>Parapoteriostomum mongolica</i>
Cylicodontophorus	<i>Cylicodontophorus bicoronatus</i> <i>Cylicodontophorus reineckeii</i>
Cylindropharynx	<i>Cylindropharynx longicauda</i> <i>Cylindropharynx brevicauda</i> <i>Cylindropharynx intermedia</i>
Petrovinema	<i>Petrovinema poculatum</i> <i>Petrovinema skrjabini</i>
Poteriostomum	<i>Poteriostomum imparidentatum</i> <i>Poteriostomum ratzii</i>
Tridentoinfundibulum	<i>Tridentoinfundibulum Gobi</i>
Gyalocephalus	<i>Gyalocephalus capitatus</i>
Hsiungia	<i>Hsiungia pekingensis</i>
Caballonema	<i>Caballonema longicapsulatum</i>